



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

## **Caracterización Bioquímica de Tirosina Fosfatasas de Tejidos Esteroidogénicos**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área: Ciencias Biológicas

**Licenciada Alejandra Beatriz Gorostizaga**

Director de Tesis: Dra. Cristina del Valle Paz  
Consejero de Estudios: Dra. Nora Ceballos

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fosfatasas de Proteínas como Transductores de Señales Extracelulares. Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas. Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2008

---

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE TIROSINA FOSFATASAS DE TEJIDOS ESTEROIDOGÉNICOS

En este trabajo se demuestra que las hormonas esteroideas son capaces de modular tanto la actividad de tirosina fosfatasas como el nivel de expresión de las mismas. Se identificaron dos tirosina fosfatasas citosólicas activadas por ACTH/PKA en *zona fasciculata* de adrenal de rata: PTP1D y PTP-PEST, de 80 y 115 kDa respectivamente. Ambas son fosforiladas *in vitro* y activadas por PKA lo que sugiere que el efecto de activación hormonal observado *in vivo* es desencadenado por eventos de fosforilación mediados por esta quinasa. Se propone que estas enzimas podrían estar involucradas en la regulación del citoesqueleto y/o la inducción de la proteína StAR (**S**teroidogenic **A**cute **R**egulatory) y de otras proteínas involucradas en la regulación aguda de la esteroideogénesis. Con respecto al nivel de expresión de fosfatasas, se describe que la acción hormonal y un agente estresor producen la inducción a nivel transcripcional de una fosfatasa dual: MAP quinasa fosfatasa-1 (MKP-1), en células adrenocorticales y de Leydig. El efecto de inducción hormonal es mediado, al menos en parte, por PKA y es independiente de la activación de ERK1/2. El efecto de inducción de MKP-1 promovido por el estrés por calor es dependiente de la actividad de ERK1/2.

Estudios realizados a futuro permitirán identificar los sustratos de estas fosfatasas para poder así determinar cuál es el rol de cada tirosina fosfatasa inducida y/o activada hormonalmente en la biología de las células productoras de hormonas esteroideas.

Palabras Claves: Tirosina Fosfatasas, ACTH, Esteroideogénesis, MAPKs, PKA.

---

## BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF TYROSINE PHOSPHATASES FROM STEROIDOGENIC TISSUES

The present work demonstrates that steroidogenic hormones are able to modulate not only tyrosine phosphatase activity, but also its expression levels. Two cytosolic enzymes activated by ACTH/PKA in ZF of rat adrenal gland, PTP1D and PTP-PEST (80 and 115 kDa respectively), were identified. Both enzymes are phosphorylated and activated *in vitro* by PKA suggesting that the effect of hormonal activation observed *in vivo* is triggered by phosphorylation mediated by this kinase. It is proposed that these proteins could be involved in the regulation of cytoskeleton and/or StAR protein (**S**teroidogenic **A**cute **R**egulatory) induction and other proteins related to the regulation of acute steroidogenesis. Regarding to phosphatase expression levels, in this work it is described that hormonal action and heat stress trigger the transcriptional induction of a dual specificity phosphatase: MAP Kinase Phosphatase-1 (MKP-1), in adrenocortical and Leydig cells. The hormonal effect is mediated at least partially by PKA and is independent of ERK1/2 activation. However, the induction of MKP-1 triggered by heat stress is dependent on ERK1/2 activity.

Future studies will identify the substrates of these phosphatases in order to determine the role of each tyrosine phosphatase induced and/or hormonally-activated in steroidogenic cells biology.

Key Words: Tyrosine Phosphatases, ACTH, Steroidogenesis, MAPKS, PKA

- En primer lugar quería agradecerle a la Dra. Cristina Paz quien me ha enseñado pacientemente y con mucho cariño a recorrer este camino. No sólo la respeto, sino que la admiro profundamente. Gracias Cris por hacer de esta tesis algo posible.
- Al Dr. Ernesto J. Podestá por permitirme trabajar en su laboratorio.
- Al Dr. Carlos Méndez por la lectura crítica de este texto y por tener siempre a palabra justa en el momento indicado.
- A mi amiga Andrea por ayudarme a navegar por los vastos océanos del idioma castellano para hacer que palabras y signos de puntuación estén correctamente ubicados dentro de este texto. Gracias Andre por compartir tantos momentos, tu amistad es algo muy importante para mí.
- A mi amiga Laura Brion, quien día a día me enseña que se puede estar mejor. Gracias Lau por bancarme muchas a nivel personal y laboral. Por muchos Aroma más.
- A mi primera compañerita de mesada Ceci P, quien siempre está dispuesta a brindar una mano. Gracias por tantas horas amenas de estudio durante varias etapas de nuestras carreras.
- A las más peques del lab: Guada y Mechi porque este poco tiempo compartido resultó el suficiente y exacto para tenerles gran cariño.
- A Fer, Ale Duarte y Rocío por ponerle una nota de color al laboratorio que hace todo más entretenido. Gracias a las tres por preocuparse por mí y por darme una mano siempre.
- A los muchachos del lab: Pablo, Hernán y Ulises por aportar un oasis de Yes en un desolador desierto de Xs.
- A las chicas más nuevas del lab: Drea, las Marianas, Jesica, Cris K y Amparo, porque juntas comenzamos a construir nuevos recuerdos.
- A Isa por ser tan agradable y tan buena onda. A Fabiana por colaborar conmigo en varias ocasiones.
- A todos los que han formado parte del laboratorio en otros tiempos: Flor Cano, Vicky Salgado, Vicky Rodríguez, Paula Bey, Silvia Pedetta, Sabrina Copsel, Luciana Gadda. Gracias por dejar lindos recuerdos.
- A los integrantes del laboratorio de Diana K: Andy, Marcela, Rodolfo y Laura por brindarme su amistad y su apoyo en todo momento. También agradezco a las más pequeñas: Caro, Delfina y Ale por ser tan simpáticas y buena onda.
- A Luciana Pietranera, Julio Bayona y Rubén Venerus por haberme ayudado en la tarea docente mientras estuve enferma.

- A todo el personal docente y no docente del Departamento de Bioquímica Humana.
- A la Dra. Juana Pasquini y a toda la gente del Departamento de Química Biológica Patológica de la Facultad de Bioquímica.
- A Edgardo, ex-secretario del Departamento de Bioquímica Humana, por ayudarme en más de una oportunidad. Realmente se lo extraña.
- A mis dos amigas del alma Paula y Corina por todos estos años compartidos llenos de innumerables momentos y todo tipo de emociones. Nuestra amistad es algo que me llena la vida. A Paula por su mirada crítica sobre este trabajo y por su ayuda y su paciencia para que esta presentación tenga un formato agradable a la vista. A Cori porque sé que aunque está como a 14000 km de distancia, nuestra amistad sigue intacta. Chicas creo que está demás decirles que las quiero mucho. Pau, también tengo que agradecerle a Martín por su paciencia y por cocinarnos mientras estábamos en la ardua lucha.
- A Sole, quién me acompañó en momentos muy difíciles.
- A toda la familia kioskeril: Mariana, Marian, Chechu, Vale, Sandra, Caro, Facu, Kari, Vane, Vero, Lupe, Facu, porque como buena familia, siempre están ahí.
- A mi mamá por haberme inculcado el amor por el estudio, por haber hecho posible que yo tuviera una carrera universitaria y por haberme enseñado a luchar.
- A mi hermana y mi sobrino porque a pesar de todas las tormentas seguimos juntos en este barco.
- A todos los integrantes de la familia Maloberti: Ana, Enrique, la abuela Lita, Fede y Andrea quienes con su cariño y hospitalidad me han hecho sentir una más de la familia en innumerables oportunidades.
- A Carlos porque me ayudó mucho durante este tiempo.
- A Federico Camicia por mostrarme que todavía existe gente solidaria, buena y generosa.
- A Fede por llevarme a comprar las hojas en las que está impreso este trabajo. Gracias por la buena onda.
- A Duilio por haber hecho muchas cosas por mí durante el transcurso de estos años. Gracias de todo corazón.
- A mis amigos virtuales Javier y Agus que me han acompañado a través de la pantalla durante noches enteras.

A la memoria de mi madre

AA: Ácido araquidónico  
Act D: Actinomicina D  
Acot2. Acil-CoA tioesterasa mitocondrial  
ACS4: Acil-CoA sintetasa 4  
ACTH: Adrenocorticotrofina u hormona adrenocorticotrofica  
AMPc: Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico  
ATP: Adenosina trifosfato  
BSA: Albúmina sérica bovina  
CHX: Cicloheximida  
Cpm: Cuentas por minuto  
dNTP: Deoxi-nucleótido trifosfato  
DBI: Inhibidor de unión al diazepam  
DTT: Ditioneitol  
DSPs: Fosfatasas de actividad dual  
EDTA: Ácido etilén diamino tetra-acético  
EGTA: Ácido etilén glicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetraacético  
ERKs: Quinasas reguladas por señales extracelulares  
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GDP: Guanosina difosfato  
GTP: Guanosina trifosfato  
hCG: Gonadotropina coriónica  
JNKs o SAPKs: Quinasas del extremo N-terminal del factor de transcripción c-jun o quinasas activadas por estrés  
LH: Hormona luteinizante  
MAPKs: Proteína quinasas activadas por mitógenos  
MAPKK: MAP quinasa quinasa  
MAPKKK: MAP quinasa quinasa quinasa  
MKPs: MAP quinasa fosfatasas  
P4: Progesterona  
P5: Pregnenolona  
P450sc: Complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol  
PBR/TSPO: Receptor periférico de benzodiazepinas/translocator protein  
pGT: Poli-glutámico-tirosina  
PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc

PKC: Proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos

PLC: Fosfolipasa C

PMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro

Proteína StAR: Steroidogenic Acute Regulatory

PSTPs: serina/treonina fosfatasas

PTPs; Proteína tirosina fosfatasas "clásicas"

RIA: Radioinmunoanálisis

TRIZOL: Fenol-isotiocianato de guanidina

TBS: Solución salina-Tris

TTBS: solución salina Tris-Tween

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

ZF: Zona fasciculata

ZG: Zona reticularis

ZR: Zona glomerulosa

7TMS: Siete regiones transmembrana

8Br-AMPC: 8Bromo-3', 5'-AMPC



<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	
<b><u>I. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y MOLÉCULAS INVOLUCRADAS</u></b>	<b>1</b>
<b><u>I.1. Generalidades</u></b>	<b>1</b>
<b><u>I.2. Receptores hormonales</u></b>	<b>2</b>
<b><u>I.3. Proteínas G y la generación de segundos mensajeros</u></b>	<b>3</b>
<b><u>I.4. Proteína quinasas</u></b>	<b>4</b>
<b><u>I.4.1. Tirosina quinasas: estructura y mecanismo de activación</u></b>	<b>5</b>
<b><u>I.4.2. Serina/treonina quinasas</u></b>	<b>5</b>
<b><u>I.4.2.a. La Proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA)</u></b>	<b>6</b>
<b><u>I.4.2.b. La Proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos (PKC)</u></b>	<b>7</b>
<b><u>I.4.2.c. Proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKS)</u></b>	<b>8</b>
<i>-Mecanismo de activación y regulación de la actividad de las MAPKS</i>	<b>9</b>
<i>-Sustratos de las MAPKS</i>	<b>11</b>
<b><u>I.5. Proteína fosfatasa</u></b>	<b>12</b>
<b><u>I.5.1. Proteína serina/treonina fosfatasa (PSTPs)</u></b>	<b>12</b>
<i>-Regulación de las PSTPs</i>	<b>13</b>
<b><u>I.5.2. Proteínas con actividad de tirosina fosfatasa</u></b>	<b>14</b>
<b><u>I.5.2.a. Proteína tirosina fosfatasa "clásicas" o PTPs</u></b>	<b>15</b>
<i>-Regulación de la actividad de PTPs</i>	<b>17</b>
<b><u>I.5.2.b. Fosfatasa de actividad dual (DSPs)</u></b>	<b>19</b>
<i>-Estructura de las MKPs</i>	<b>20</b>
<i>-Especificidad de sustrato de las MKPs</i>	<b>22</b>
<i>-Regulación transcripcional y post-traducciona de las MKPs</i>	<b>23</b>
<b><u>II. ESTEROIDOGÉNESIS Y SU CONTROL HORMONAL</u></b>	<b>25</b>
<b><u>II.1. Tejidos productores de esteroides</u></b>	<b>25</b>
<i>-Glándula adrenal</i>	<b>25</b>
<i>-Testículo</i>	<b>27</b>
<i>-Otros tejidos productores de esteroides</i>	<b>27</b>
<b><u>II.2. Biosíntesis de hormonas esteroides</u></b>	<b>28</b>
<b><u>II.3. Cascada de señalización de las hormonas esteroidogénicas</u></b>	<b>29</b>
<i>-Activación de MAPKS por hormonas esteroidogénicas</i>	<b>31</b>
<b><u>II.4. Regulación hormonal de la síntesis de esteroides</u></b>	<b>32</b>
<b><u>II.4.1. Proteínas involucradas en el transporte del colesterol</u></b>	<b>34</b>
<i>-Receptor periférico de benzodiazepinas (PBR)</i>	<b>34</b>
<i>-StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) protein</i>	<b>34</b>
<i>-Proteínas que controlan los niveles de ácido araquidónico intracelular</i>	<b>35</b>

<b>II.4.2. <u>Acción de ERK1/2 en la regulación de la esteroidogénesis</u></b>	<b>36</b>
<b>III. <u>PROTEÍNA FOSFATASAS DE CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS</u></b>	<b>37</b>
<b>III.1. <u>Regulación y función de serina/treonina fosfatasas de células esteroidogénicas</u></b>	<b>37</b>
<b>III.2. <u>Desfosforilación en residuos de tirosina inducida por ACTH</u></b>	<b>38</b>
<b>III.3. <u>Actividad de tirosina fosfatasas de células esteroidogénicas</u></b>	<b>39</b>
<b>III.4. <u>Papel funcional de la actividad de tirosina fosfatasas en células esteroidogénicas</u></b>	<b>41</b>
<i>-El papel del citoesqueleto en la esteroidogénesis</i>	<b>41</b>
<i>-Inducción hormonal de la esteroidogénesis</i>	<b>42</b>
<i>-Inducción de hidroxilasas de la síntesis de esteroides</i>	<b>42</b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b>46</b>
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	
<b>I. <u>Reactivos</u></b>	<b>48</b>
<b>II. <u>Animales</u></b>	<b>49</b>
<b>III. <u>Líneas celulares</u></b>	<b>49</b>
<b>IV. <u>Estimulación de glándulas adrenales <i>in vivo</i></u></b>	<b>50</b>
<b>V. <u>Estimulación de células en cultivo</u></b>	<b>50</b>
<i>-Estimulación de células de la línea MA-10</i>	<b>50</b>
<i>-Estimulación de células Y1 y MA-10 por golpe de calor</i>	<b>51</b>
<b>VI. <u>Obtención de lisados celulares</u></b>	<b>51</b>
<b>VII. <u>Fraccionamiento subcelular de glándulas adrenales</u></b>	<b>52</b>
<b>VIII. <u>Purificación parcial de la tirosina fosfatasa de 115 kDa (PTP115)</u></b>	<b>52</b>
<i>-Precipitación fraccionada con soluciones de saturación creciente de sulfato de amonio <math>(NH_4)_2SO_4</math></i>	<b>53</b>
<i>-Cromatografía de intercambio iónico</i>	<b>53</b>
<b>IX. <u>Ensayos de actividad de tirosina fosfatasa</u></b>	<b>54</b>
<i>-Fosforilación de poli-glutámico-tirosina (pGT)</i>	<b>54</b>
<i>-Ensayo de actividad de tirosina fosfatasa en solución</i>	<b>55</b>
<i>-Ensayo de actividad de tirosina fosfatasa en gel</i>	<b>56</b>
<b>X. <u>Análisis de proteínas</u></b>	<b>57</b>
<i>-Electroforesis de proteínas</i>	<b>57</b>
<i>-Western blot</i>	<b>58</b>
<i>-Inmunoprecipitación</i>	<b>59</b>
<b>XI. <u>Fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas de ZF de adrenal de rata</u></b>	<b>59</b>

<b><u>XII. Análisis de ARN mensajero</u></b>	
- <u>Extracción de ARN total</u>	<b>60</b>
- <u>Ensayos de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa</u>	<b>61</b>
- <u>Marcado de la sonda por el método de oligonucleótidos al azar</u>	<b>62</b>
- <u>Northern blot</u>	<b>62</b>
<b><u>XIII. Otros procedimientos</u></b>	<b>64</b>
- <u>Cuantificación de proteínas</u>	<b>64</b>
- <u>Análisis estadístico</u>	
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>65</b>
<b><u>I. IDENTIFICACIÓN DE LAS PTPs DE ZF REGULADAS POR ACTH</u></b>	<b>65</b>
<b><u>I. 1. Caracterización de la tirosina fosfatasa de 115 kDa de ZF de adrenal de rata</u></b>	<b>65</b>
<b><u>I.1.1. Purificación parcial de PTP115</u></b>	<b>65</b>
<b><u>I.1.1.a. Análisis de la actividad enzimática de las muestras en las diferentes etapas del proceso de purificación</u></b>	<b>65</b>
<b><u>I.1.1.b. Obtención de la fracción citosólica de ZF de adrenal de rata</u></b>	<b>66</b>
<b><u>I.1.1.c Fraccionamiento mediante precipitación con sulfato de amonio</u></b>	<b>66</b>
<b><u>I.1.1.d. Fraccionamiento mediante columna de intercambio aniónico</u></b>	<b>68</b>
<b><u>I.1.1.e. Fraccionamiento por filtración</u></b>	<b>69</b>
<b><u>I.1.2 Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima</u></b>	<b>70</b>
<b><u>I.1.3. Identificación de la proteína semipurificada</u></b>	<b>72</b>
<b><u>I.1.4. Detección del ARNm correspondiente a PTP-PEST en células esteroideogénicas</u></b>	<b>74</b>
<b><u>I.2. Caracterización de la tirosina fosfatasa de 80 kDa de ZF de adrenal de rata</u></b>	<b>75</b>
<b><u>II. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA FOSFATASA DUAL MKP-1 EN CÉLULAS ESTEROIDOGENICAS</u></b>	<b>83</b>
<b><u>II.1. Expresión de MKP-1 en células adrenocorticales y de Leydig: Efecto de la hormona trófica y del AMPc</u></b>	<b>83</b>
<b><u>II.2. Expresión de MKP-1 en células adrenocorticales y de Leydig: Efecto del estrés por calor</u></b>	<b>93</b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>104</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>120</b>

# ***INTRODUCCIÓN***

## **I. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y MOLÉCULAS INVOLUCRADAS**

### **I.1. Generalidades**

La supervivencia de los seres vivos frente a los incesantes cambios que se producen en el medio externo se atribuye a la presencia de complejos mecanismos para sentir constantemente esas fluctuaciones. Estos mecanismos y la capacidad del organismo de elaborar respuestas altamente específicas en el marco temporal apropiado, aseguran la homeostasis. En los organismos pluricelulares, donde en general las células se agrupan formando tejidos altamente especializados, la capacidad de los diferentes tipos celulares para reconocer las diversas señales producidas por estímulos específicos y responder en forma apropiada, determina el funcionamiento armónico de estos organismos. Las señales a las cuales se hace referencia consisten en moléculas de clases muy diversas tales como: proteínas, péptidos, aminoácidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos y hasta gases disueltos, como el óxido nítrico y el monóxido de carbono.

La homeostasis de los organismos superiores se mantiene fundamentalmente a través de la acción del sistema nervioso y del sistema endócrino, mediante la liberación de neurotransmisores y de hormonas respectivamente. El sistema endócrino se compone de un número de glándulas que liberan al torrente sanguíneo hormonas, que llegan a diversos tejidos blanco ubicados en forma adyacente o distante de la glándula secretoria. La hormona será capaz de producir un efecto determinado en ese tejido mediante un mecanismo más o menos complejo que involucra varios tipos de moléculas.

Las hormonas esteroides cumplen importantes funciones regulatorias en animales de diferentes especies. Estas moléculas están involucradas en la regulación del metabolismo energético, del equilibrio hidrosalino y de la reproducción, para citar algunas de las variadas funciones. Por lo tanto la regulación de la producción de las hormonas esteroides constituye otro mecanismo homeostático importante. Esta regulación la ejercen

principalmente las hormonas esteroideas. Dado que en este trabajo de Tesis se analizaron aspectos del mecanismo de acción de estas hormonas, en esta introducción se describirán algunas moléculas que participan en la acción hormonal en general, pero con particular énfasis en aquellas que participan en la acción de hormonas que regulan la esteroidogénesis.

## **I.2. Receptores hormonales**

Las células que responden a una dada hormona poseen moléculas capaces de reconocer y unir estas hormonas con alta afinidad y especificidad. A estas moléculas se las denomina receptores. Un grupo importante de hormonas está formado por moléculas capaces de difundir a través de las membranas e interactuar con receptores intracelulares, por ejemplo las hormonas tiroideas. Sin embargo, la mayoría de las hormonas, en general de naturaleza proteica, presentan receptores ubicados en la superficie de la membrana plasmática. Las hormonas esteroideas son un caso particular, ya que pese a ser pequeñas y de naturaleza liposoluble, presentan receptores de ambos tipos: de membrana e intracelulares.

Los receptores de membrana son estructuras que participan en la transmisión de la información desde el espacio extracelular hacia el interior. Este flujo de información requiere la participación de otras moléculas altamente específicas, además de los receptores, cuya acción coordinada constituye lo que se denomina mecanismo de transducción de señales.

Todos los receptores de membrana tienen al menos un dominio extracelular donde se localiza el sitio de unión al ligando y un dominio citoplasmático. La interacción del receptor con el ligando altera la estructura del receptor, incluyendo el o los dominio(s) intracelular(es). Sin embargo, estos cambios estructurales no son suficientes para dar una respuesta apropiada, porque están restringidos a un pequeño número de receptores en la membrana de la célula. La información transmitida por el ligando -llamado mensajero primario- debe ser transducida en otra forma que altere la bioquímica de la célula.

Para un grupo de hormonas la unión a su receptor promueve la actividad de quinasa de tirosina del mismo (Carraway y col., 1994; Schlessinger y Lemmon, 2006). A modo de ejemplo pueden citarse los receptores de los factores de crecimiento como el EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor) y el receptor de insulina. La unión del EGF o la insulina a su respectivo receptor desencadena la autofosforilación del mismo en residuos de tirosina y dicha modificación promueve la capacidad del receptor de catalizar la fosforilación en tirosina de otros sustratos y modificar la actividad de los mismos.

Existe una familia muy amplia de receptores cuyos miembros exhiben una característica estructural común que consiste en la presencia de 7 regiones transmembrana, motivo por el cual se los denomina 7TMS (**T**rans-**M**embrane **S**egments). Estos receptores presentan el extremo amino en el espacio extracelular y el extremo carboxilo en el espacio citoplasmático (Lefkowitz, 2007). Como se describirá a continuación, gran parte de los ligandos que se unen a receptores de membrana del tipo 7TMS utilizan pequeñas moléculas, llamadas segundos mensajeros, para transducir la información al interior de la célula haciendo posible el efecto biológico.

### **I.3. Proteínas G y la generación de segundos mensajeros**

El funcionamiento de los receptores 7TMS está vinculado con un grupo de proteínas que unen nucleótidos de guanina, denominadas proteínas G. Estas proteínas están constituidas por 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La caracterización de estas subunidades muestra la existencia de un amplio número de isoformas que han sido agrupadas en cuatro familias:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_q$ ,  $\alpha_{12}$  (Milligan y Kostenis, 2006). La unión de la hormona al receptor promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G y la disociación de la subunidad  $\alpha$ -GTP del dímero  $\beta\gamma$ . A continuación,  $\alpha$ -GTP y el dímero  $\beta\gamma$  inician las respuestas intracelulares activando una variedad de moléculas efectoras. El papel funcional de las subunidades  $\alpha$  –ampliamente descrito– incluye la activación de diferentes moléculas efectoras tales como enzimas, canales iónicos, transportadores de iones, etc. (Lambright y col., 1994; Sondek y col., 1996). En contraste, la función de los dímeros  $\beta\gamma$  no ha sido tan ampliamente

caracterizada. Sin embargo, actualmente se conoce que estas subunidades tienen también un rol en la señalización intracelular. A modo de ejemplo puede mencionarse que estos dímeros son capaces de activar rutas bioquímicas que conducen a la activación de una familia de quinasas que se conoce con el nombre de quinasas activadas por mitógenos (**Mitogen Activated Protein Kinases**, MAPKs) (Sugden y Clerk, 1997).

Algunas de las enzimas cuya actividad se altera como resultado del acople entre el receptor y la correspondiente subunidad  $\alpha$ -GTP son fosfolipasas, fosfodiesterasas y la adenilil ciclasa, entre otras. La activación de estas enzimas promueve cambios en la concentración intracelular de pequeñas moléculas que cumplen un rol amplificando la señal disparada por la hormona. A estas moléculas se las denomina segundos mensajeros.

La adenilil ciclasa, por ejemplo, cataliza la formación de AMPc a partir de ATP. Otros segundos mensajeros particularmente importantes y cuya concentración aumenta en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteínas G son: inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG), Ca<sup>2+</sup> y GMPc. La generación de segundos mensajeros forma parte de mecanismos que convergen en la activación de quinasas y la consecuente fosforilación de proteínas. Esta modificación covalente cambia las propiedades estructurales de las proteínas y en la mayoría de los casos, este cambio está asociado a la modulación de la actividad biológica de las mismas. El resultado es una alteración en la actividad celular, que puede resultar en un cambio en la expresión de genes.

El grado de fosforilación de las proteínas no depende sólo de la actividad de proteína quinasas. El balance neto de las actividades de dos tipos de enzimas, proteína quinasas y proteína fosfatasas es muy importante para la señalización intracelular. A continuación se describirán aspectos relacionados con estos dos tipos de moléculas: proteína quinasas y proteína fosfatasas.

#### **I.4. Proteína quinasas**

Las proteína quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato en posición  $\gamma$  del ATP a los grupos hidroxilo de los aminoácidos



serina, treonina o tirosina de diversas proteínas. Según el aminoácido al cual transfieren el grupo fosfato, estas enzimas se clasifican en: tirosina quinasas o serina/treonina quinasas.

#### **I.4.1. Tirosina quinasas: estructura y mecanismo de activación**

Existen tirosina quinasas de localización intracelular como por ejemplo las quinasas Jaks (***Janus tyrosine kinase***), cuya actividad se requiere para la fosforilación de las proteínas Stats (***Signal transducers and activators of transcription***) inducida por ligandos (Ihle y col., 1994; Schlessinger y Lemmon, 2006) o la quinasa Src (Shchemelinin y col., 2006). Sin embargo, el grupo más ampliamente caracterizado de tirosina quinasas es el conformado por los receptores de membrana con actividad de tirosina quinasa (RTKs, ***Receptor Tyrosine Kinase***). Estos receptores son los mediadores de la acción de diversos factores de crecimiento (Aaronson, 1991).

La unión del ligando a su RTK produce, en algunos casos a través de la dimerización del receptor (Carraway y col., 1994; Heldin, 1995), la fosforilación en tirosina de múltiples sitios ubicados en la porción citoplasmática de la enzima. La fosforilación de estos sitios es importante porque allí se generan sitios de anclaje para las moléculas blanco (Pawson y Gish, 1992; Bork y Margolis, 1995). Dichas moléculas son capaces de unirse a los residuos fosforilados en tirosina a través de sus dominios SH2 (dominios homólogos a Src 2).

Un RTK activado puede desencadenar la activación de sus moléculas blanco mediante la fosforilación en tirosina de las mismas. Por ejemplo el EGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) disparan la fosforilación de los factores de transcripción Stat a través de la activación de sus receptores (Ruff-Jamison y col., 1995; Vignais y col., 1996).

#### **I.4.2. Serina/treonina quinasas**

La actividad de estas quinasas puede ser regulada por eventos específicos (daño al ADN) o por numerosas señales químicas que incluyen

---

AMPC, GMPc, DAG, y  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, entre otros. A continuación se describen características bioquímicas de algunas de estas quinasas.

#### **I.4.2.a. La Proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA)**

La proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), representa un mediador central en la señalización intracelular capaz de regular procesos celulares tales como la proliferación y diferenciación (Vermeulen y col., 2003), la organización de la red de microtúbulos (Howe, 2004), la condensación y descondensación de la cromatina (Granneman y col., 2007) y la exocitosis en diversos tipos celulares (Sedej y col., 2005). En el estado inactivo, PKA existe como un complejo tetramérico que consiste en dos subunidades regulatorias (subunidades R) que presentan alta afinidad por el AMPc, y dos subunidades catalíticas (subunidades C) unidas de forma no covalente. Se han caracterizado varias isoformas de subunidades R y de las subunidades C (Skalhegg y Tasken, 2000). Estas subunidades se expresan diferencialmente en los distintos tejidos, y son capaces de integrar distintas isoformas de PKA (Skalhegg y Tasken, 2000).

El mecanismo de activación de PKA involucra la unión del AMPc a los sitios denominados A y B en cada subunidad R. En el estado inactivo de la holoenzima, solamente el sitio B está expuesto y disponible para la unión al AMPc. Cuando se ocupa este sitio se incrementa la unión del AMPc al sitio A por un cambio estérico intramolecular. La unión de cuatro moléculas de AMPc, dos a cada subunidad R, lleva a un cambio conformacional y a la disociación de un dímero de R unido a cuatro moléculas de AMPc y de dos monómeros de C. Las subunidades C, que en este estado son catalíticamente activas, fosforilan a sus sustratos específicos en residuos de serina y treonina.

Las subunidades R, particularmente las isoformas RII, pueden asociarse con proteínas de anclaje llamadas AKAPs (**A-Kinase Anchoring Proteins**) que permiten localizar a la holoenzima PKA en diferentes compartimientos para fosforilar diferentes sustratos según el estímulo (Smith y Scott, 2006). Como ya se mencionó la participación de PKA es relevante para distintos mecanismos de transducción de señales. En las siguientes secciones se

describirá la participación de PKA en un proceso regulado hormonalmente: la síntesis de hormonas esteroides.

#### **I.4.2.b. La Proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos (PKC)**

La proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos (PKC) es una serina/treonina quinasa de expresión ubicua y localización citoplasmática. Las diferentes isoformas de PKC forman parte del mecanismo de transducción de señales disparado por numerosas hormonas como la insulina (Formisano y Beguinot, 2001) y angiotensina II (Sampson y col., 2007) entre otras. Más aún, está ampliamente caracterizada la participación de PKC en la regulación hormonal de la producción de esteroides adrenocorticales (Reyland, 1993) como se mencionará en el capítulo siguiente.

Las isoformas de PKC constituyen una familia de al menos once miembros que se dividen en subfamilias en base a su capacidad de unión a ésteres de forbol y su dependencia de fosfolípidos o Ca<sup>2+</sup>. Existen isoformas clásicas dependientes de Ca<sup>2+</sup> e isoformas noveles y atípicas, que son independientes de este catión. Las isoformas clásicas y noveles se unen a ésteres de forbol, mientras que las isoformas atípicas no se unen a estos compuestos (Soderling, 1990; Dempsey y col., 2000; Corbalan-García y Gómez-Fernández, 2006).

En lo que respecta a su estructura general, las diferentes isoformas de PKC poseen dos dominios funcionales: un dominio regulatorio (R) en la región más próxima al extremo N-terminal y un dominio catalítico (C) ubicado hacia el extremo carboxilo de la molécula (Kikkawa y col., 1989). El dominio R está involucrado en la respuesta a Ca<sup>2+</sup> y la unión a fosfolípidos (Dempsey y col., 2000) y contiene una región autorregulatoria o de pseudosustrato que bloquea, en condiciones basales, el sitio catalítico (Soderling, 1990; Dempsey y col., 2000; Corbalan-García y Gómez-Fernández, 2006).

Respecto al mecanismo de activación de las PKCs, las isoformas clásicas se activan por DAG, que es un producto de la hidrólisis del compuesto fosfatidilinositol 4-5 bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) por la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC) inducida por diferentes agonistas (Nishizuka, 1984). El IP<sub>3</sub>, otro

producto que se libera por la acción de la fosfolipasa C sobre PIP<sub>2</sub>, provoca la movilización del Ca<sup>2+</sup> que requieren al menos las isoformas dependientes del catión. El DAG y el Ca<sup>2+</sup> contribuyen a un cambio conformacional de las isoformas clásicas que lleva a la pérdida de la interacción entre el sitio catalítico y la región de pseudosustrato que existe en condiciones basales. Ante la pérdida de esta interacción, el sitio catalítico queda libre para fosforilar a las proteínas que son sustrato de PKC.

#### **I.4.2.c. Proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKS)**

Las MAPKs constituyen una familia de enzimas con una función particularmente importante en las vías de transducción de señales que median la respuesta nuclear de las células a los cambios en su ambiente. Los miembros de esta familia de enzimas pueden subdividirse en varios grupos según el tipo de estímulo que provoca su activación, entre otras características. De estos grupos sólo tres de ellos han sido ampliamente estudiados. Los mismos están constituidos por las quinasas reguladas por señales extracelulares (*Extracellular Regulated Kinases*, ERKs), las quinasas del extremo N-terminal del factor de transcripción c-jun (*Jun N-terminal Kinase*, JNKs) -también conocidas como quinasas activadas por estrés (*Stress Activated Protein Kinases*, SAPKs)-, y el grupo de p38 (Roux y Blenis, 2004).

La familia de las ERKs incluye dos enzimas denominadas ERK1 y ERK2 que exhiben una alta identidad de secuencia, especialmente en el dominio de unión al sustrato (Boulton y Cobb, 1991). Estas proteínas, de 44 y 42 kDa de peso molecular respectivamente, se expresan de manera ubicua y se activan principalmente en respuesta a factores de crecimiento y ésteres de forbol, entre otros (Nguyen y col., 1993; Manna y col., 2007). El grupo de las JNKs se activa en respuesta a múltiples formas de estrés ambiental y a citoquinas (Ip y Davis, 1998). Se conocen tres genes que codifican para las JNKs en mamíferos. Los genes que codifican para JNK1 y JNK2 se expresan en forma ubicua y generan 8 isoformas por maduración alternativa del ARN mensajero (Gupta y col., 1996).

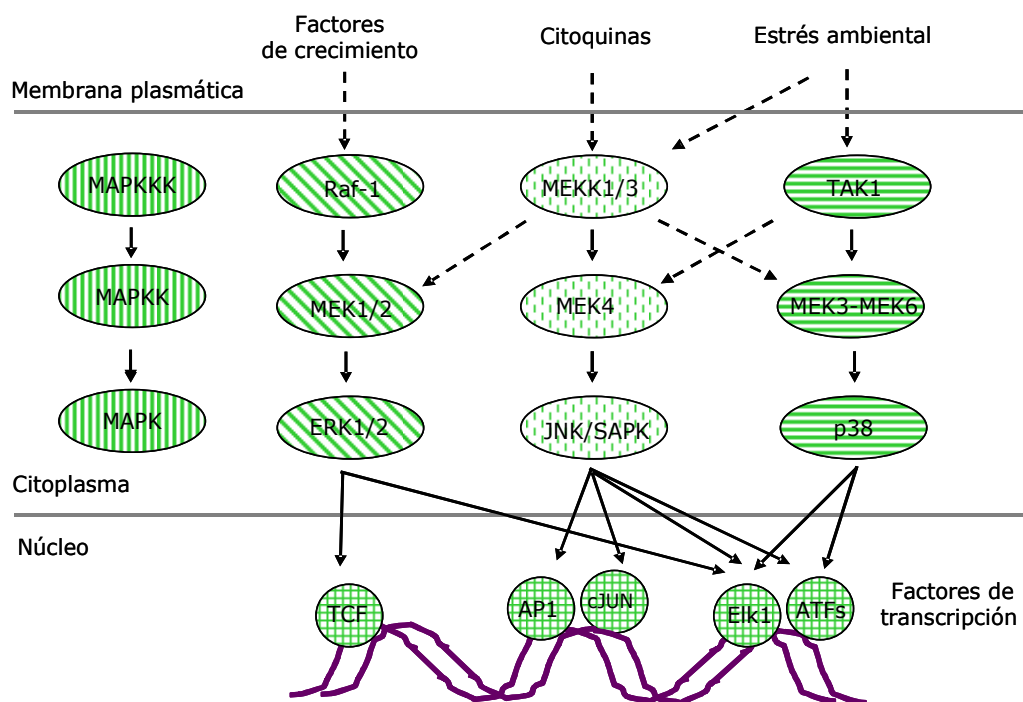
El grupo de p38, que incluye a las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , también se activa por exposición de las células a citoquinas (Ashwell, 2006) y a distintos tipos de estrés ambiental (Obata y col., 2000), endotoxinas (Abraham, 2005), hiperosmolaridad (Kyriakis y Avruch, 1996), pero no es activado apreciablemente por estímulos mitogénicos. Muchos estímulos que activan p38 también activan a las JNKs.

#### -Mecanismo de activación y regulación de la actividad de las MAPKs

Una característica común de los miembros de los tres subgrupos de MAPKs está relacionada con su mecanismo de activación. Todas las isoformas requieren ser fosforiladas en dos residuos, treonina y tirosina, para exhibir máxima actividad (Raman y col., 2007). El sitio de fosforilación, ubicado en el dominio quinasa, consiste en un tripéptido con una secuencia general treonina-x-tirosina. Los diferentes grupos de MAPKs están definidos por la identidad del aminoácido x que separa a los residuos de treonina y tirosina fosforilados, siendo el motivo de fosforilación dual thr-**glu**-tyr, thr-**gly**-tyr y thr-**pro**-tyr para los grupos de MAPKs: ERKs, p38 y JNKs respectivamente (Davis, 2000).

Los mecanismos que conducen a la activación de las MAPKs están vinculados tanto con los RTKs, como con los receptores 7TMS. Diversos estímulos que actúan a través de la activación de estos receptores promueven una cascada de eventos de fosforilación que conduce a la activación de las MAPKs. En esta cascada de fosforilaciones interviene un grupo de quinasas de actividad dual: las MAP quinasa quinasas (MAPKKs o MKKs). Las MAPKKs son altamente específicas e incluyen a MEK1 y MEK2, que activan a las ERKs; MKK3, MKK4 y MKK6 que activan al grupo de p38 y las isoformas MKK4 y MKK7 que activan al grupo de JNKs. A su vez, las MAPKKs son activadas por fosforilación mediada por las MAP quinasa quinasa quinasas (MAPKKKs). Un grupo de MAPKKKs está integrado por las quinasas Raf (a y b), las cuales acoplan la activación de las ERKs, vía MEK1 y MEK2, a una proteína que une GTP denominada Ras (Kolch, 2000). La activación de Ras ocurre vía RTKs y receptores acoplados a proteína G. El grupo de JNKs, al igual que el de p38, es activado por varias MAPKKKs, incluyendo el grupo de las MEK quinasas

(MEKK) (Figura 1). La cascada de fosforilaciones que llevan a la activación de las MAPKs es facilitada por interacciones con proteínas adaptadoras o de anclaje, que organizan los caminos de señalización permitiendo el contacto simultáneo de varios componentes, garantizando la activación de una vía de señalización específica frente a un estímulo determinado (Kolch, 2000; Roux y Blenis, 2004; Sampson y col., 2007).



**Figura 1. Esquema de las vías de activación de las MAPKs.** La activación de las MAPKs incluye la fosforilación y activación secuencial de distintas proteínas por acción de diferentes quinasas específicas: las MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKKs) y las MAP quinasa quinasa (MAPKKs). Los estímulos desencadenan la activación del primer miembro de la cascada: MAPKKK.

Debido a que las MAPKs tienen un rol relevante en la señalización intracelular, es esencial que se ejerza sobre ellas una regulación muy estricta. El control de la magnitud y duración de la activación de estas proteínas es llevado a cabo por fosfatasas de tirosina, de serina/treonina y de especificidad dual. Entre las fosfatasas de serina/treonina que actúan sobre las MAPKs podemos mencionar a las proteínas fosfatasas 2A y 2C (PP2A y PP2C) (Saxena

y Mustelin, 2000). Entre las tirosina fosfatasas que desfosforilan a las MAPKs se encuentran las enzimas STEP (***Striatum Enriched Phosphatase***) y PTP-SL (***Protein Tyrosine Phosphatase-STEP Like***), que desfosforilan particularmente a ERK1/2 (Torres y col., 2004). Sin embargo, un grupo particular de fosfatasas tiene como función específica desfosforilar a los miembros de la familia de las MAPKs. Estas fosfatasas se denominan en general MAP quinasa fosfatasas (***MAP Kinase Phosphatases*** o ***MKPs***) y exhiben actividad dual (treonina y tirosina). Este grupo será ampliamente descrito en próximas secciones.

#### -Sustratos de las MAPKs

Diferentes estímulos regulan múltiples procesos celulares mediante la acción de las MAPKs. Los miembros de cada grupo de estas enzimas presentan distinta especificidad de sustrato, lo que contribuye a la posibilidad de responder apropiadamente a una diversa gama de estímulos extracelulares. Aunque los sustratos más ampliamente caracterizados de las MAPKs son factores de transcripción, estas quinasa también fosforilan enzimas –como ciertas fosfolipasas– y proteínas del citoesqueleto (Roux y Blenis, 2004). Más aún, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio se describe la fosforilación mediada por ERK1/2 mitocondrial de una proteína esencial en la estimulación hormonal de la esteroidogénesis (Poderoso y col., 2008). Otros sustratos de las MAPKs son las proteína quinasa activadas por MAPKs (***MAPK-Activated Protein Kinases, MAPKAPK***), que intervienen en la regulación de factores de transcripción y enzimas. Estas proteínas representan un paso adicional en el camino de amplificación de las cascadas de las MAPKs (Roux y Blenis, 2004).

Además de interactuar con sus sustratos a través de la secuencia requerida para la fosforilación, las MAPKs reconocen en los sustratos secuencias de aminoácidos específicas llamadas sitios de anclaje. Estas secuencias se encuentran en las MAPKs y en sus proteínas regulatorias, como las MAPKKs, las fosfatasas STEP, PTP-SL y MKPs, entre otras y en los sustratos de las MAPKs (Tanoue y col., 2002). Mientras que en los sustratos o proteínas que interactúan con las MAPKs estas secuencias están constituidas

por aminoácidos cargados positivamente rodeados por una región hidrofóbica, en las MAPKs estas secuencias resultan ser complementarias presentando residuos con carga negativa y una región hidrofóbica (Roux y col., 2003; Roux y Blenis, 2004). Estos sitios de anclaje intervienen en la selección del sustrato y aumentan la especificidad de la fosforilación a través de las MAPKs.

## **I.5. Proteína fosfatasas**

En todo proceso celular regulado por agonistas que promueven la fosforilación de proteínas, las proteína fosfatasas funcionan para desactivar la señal disparada por el agonista. Sin embargo, atribuir a las fosfatasas esta única función es una apreciación demasiado simplista. Con el nivel de conocimiento actual sobre estas enzimas, tanto en el aspecto funcional como en el estructural y regulatorio, esta concepción ha variado. Actualmente se reconoce que estas enzimas cumplen funciones tan importantes en la regulación de la actividad celular como las proteína quinasas.

Las proteína fosfatasas son enzimas que remueven hidrolíticamente residuos fosfato específicos de las proteínas modificadas. Junto con las proteína quinasas, las proteína fosfatasas controlan la actividad celular mediada por fosfoproteínas.

### **I.5.1. Proteína serina/treonina fosfatasas (PSTPs)**

Las serina/treonina fosfatasas (***Protein Serine/Threonine Phosphatases***, PSTPs, o ***Protein Phosphatases***, PPs) son un grupo de enzimas que remueven grupos fosfato de residuos de fosfoserina y fosfotreonina de sus proteínas blanco. Este grupo de enzimas se caracteriza por presentar un número acotado de subunidades catalíticas que, en su mayoría, funcionan en complejos hetero-oligoméricos con una gran diversidad de subunidades regulatorias. Esta característica le otorga a estas enzimas especificidad de sustrato y de localización subcelular (Barford, 1996; Cohen, 2002).

Las isoformas PP1, PP2A, PP2B y PP2C son las responsables de casi toda la actividad de serina/treonina fosfatasa *in vivo*.



---

### -Regulación de las PSTPs

En general, las PSTPs catalizan la desfosforilación particularmente de proteínas involucradas en procesos metabólicos. PP1 controla funciones tales como el metabolismo del glucógeno (Brady y Saltiel, 2001), la progresión del ciclo celular (Berndt, 1999) y las actividades neuronales (Morfini y col., 2004), entre otras. Además, PP1 juega un papel muy importante en procesos regulados por AMPc, ya que cataliza la desfosforilación de muchas proteínas fosforiladas por PKA (Bridges y col., 2006; Jideama y col., 2006). La subunidad catalítica de PP1 forma complejos con distintas subunidades regulatorias, interacciones que modifican su actividad o la dirigen hacia una localización particular (Shenolikar, 1994). Se ha descrito la presencia de dos inhibidores endógenos, llamados I1 e I2 que regulan a PP1A específicamente (Sim y Scott, 1999)

La proteína PP2A está formada por al menos 15 subunidades regulatorias y está involucrada en procesos tales como el metabolismo (Ceulemans y Bollen, 2004), el ciclo celular (Trinkle-Mulcahy y Lamond, 2006) y el control de la actividad de telomerasa (Chen y col., 2004), entre otros. Además se han descrito dos inhibidores endógenos de PP2A designados I1PP2A e I2PP2A (Li y Damuni, 1998).

La fosfatasa PP2B está caracterizada por su dependencia de  $Ca^{2+}$  y juega un rol crucial en la señalización a través de  $Ca^{2+}$  en células T activadas (Jain y col., 1993).

Los procesos de fosfo/defosforilación constituyen uno de los mecanismos involucrados en la regulación de PSTPs. Se ha descrito que el inhibidor endógeno de PP1, denominado I1, es fosforilado por acción de PKA en un residuo de serina, y la forma fosforilada de este péptido es un potente inhibidor de la enzima (Huang y Glinsmann, 1976). Por ejemplo en el músculo esquelético, el tratamiento con epinefrina produce la activación de PKA, la fosforilación de I1 y la consecuente inhibición de PP1, contribuyendo a mantener fosforilados a sus sustratos en residuos de serina/treonina (Huang y col., 2007).

La fosforilación en residuos de tirosina influye, además, en la actividad de las PSTPs. Se ha demostrado que PP2A es fosforilada *in vitro* en residuos

de tirosina por acción de diferentes tirosina quinasas (Janssens y Goris, 2001). Este mismo proceso se ha observado en células intactas ante el tratamiento con diferentes agonistas que activan receptores con actividad de tirosina quinasa (Chen y col., 1994; Ragolia y Begum, 1998; Janssens y Goris, 2001). En todos los casos, la fosforilación en tirosina produce la inactivación de PP2A.

La metilación es otro mecanismo relevante para la regulación de las PSTPs. Una carboxi-metiltransferasa específica metila a PP2A y esta modificación puede ser revertida en la célula intacta debido a la presencia de una metilesterasa específica (Xie y Clarke, 1994). Los efectos de esta modificación sobre la actividad de la enzima son contradictorios. Algunos autores han demostrado un incremento de la actividad por metilación (Favre y col., 1994), mientras que otros no detectaron cambios (De Baere y col., 1999) u observaron menor actividad enzimática luego de la metilación (Zhu y col., 1997).

### **I.5.2. Proteínas con actividad de tirosina fosfatasa**

Las enzimas con actividad de tirosina fosfatasa constituyen una familia de proteínas que poseen estructura diversa pero un origen evolutivo común y un sitio catalítico conservado (Charbonneau y Tonks, 1992; Stoker, 2005; Tonks, 2006). Se han identificado, hasta la fecha, más de 100 proteínas con actividad de tirosina fosfatasa, y la secuenciación del genoma humano predice la existencia de más de 500 (Alonso y col., 2004).

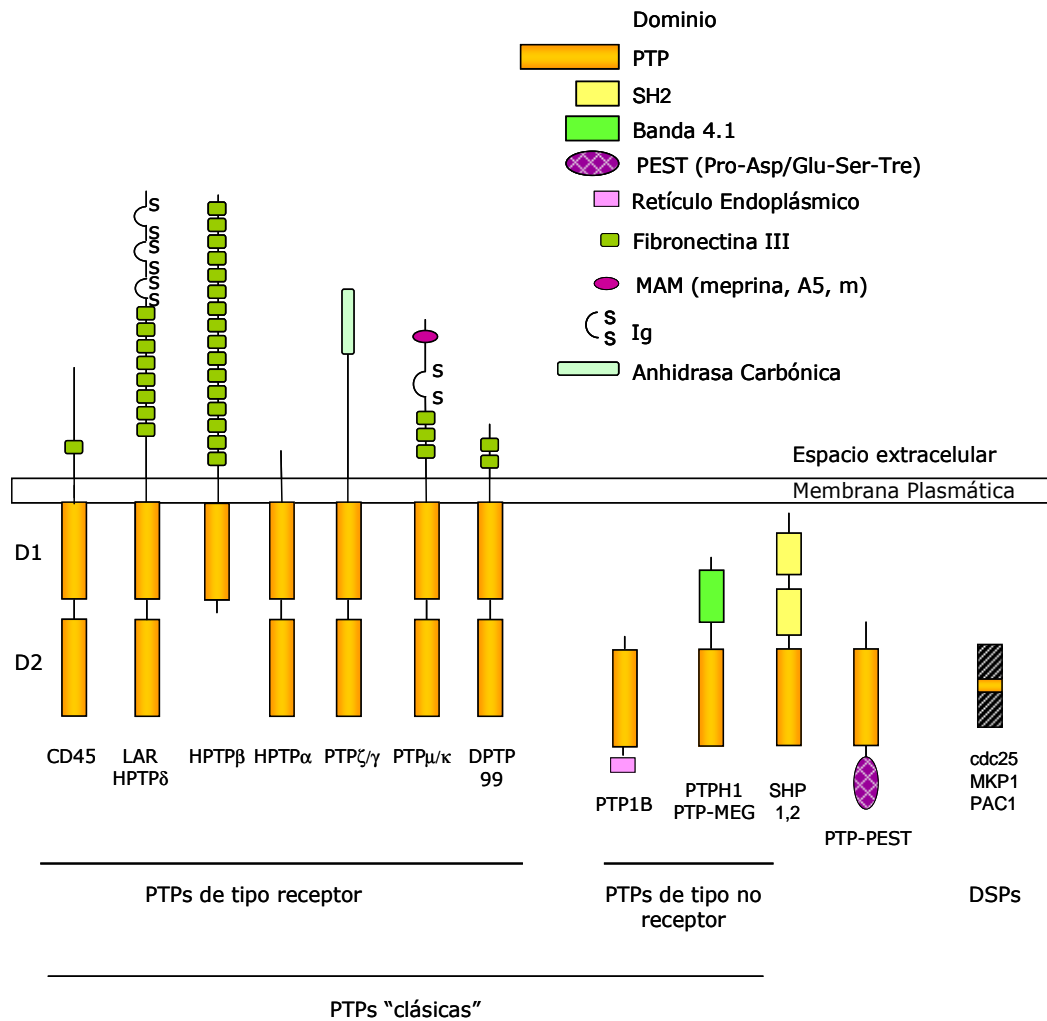
La familia de las tirosina fosfatasas comprende un grupo de enzimas que desfosforilan únicamente residuos de tirosina, llamadas tirosina fosfatasas "clásicas" (***Protein Tyrosine Phosphatases***, PTPs), y un grupo de enzimas que exhiben actividad dual ya que desfosforilan tanto residuos de serina/treonina como de tirosina. A estas enzimas se las denomina fosfatasas de actividad dual, DSPs (***Dual Specificity Phosphatases***) (Stoker, 2005; Tonks, 2006). Aunque pertenecen a la misma familia, estos dos grupos de enzimas presentan poca homología de secuencia excepto en residuos claves dentro del sitio catalítico (Denu y col., 1996).

### **I.5.2.a. Proteína tirosina fosfatasa "clásicas" o PTPs**

Las PTPs pueden subdividirse en dos grupos de acuerdo a su ubicación dentro de la célula: las que atraviesan la membrana plasmática, denominadas PTPs de tipo receptor y las que se localizan en una variedad de compartimientos intracelulares tales como el citosol y el retículo endoplasmático, entre otros, denominadas PTPs de tipo no-receptor (Figura 2).

Las PTPs son muy diversas en cuanto a su estructura ya que existe una amplia variedad de secuencias combinadas con el dominio catalítico (Andersen y col., 2001). Esta multiplicidad estructural se refleja en la disparidad de procesos celulares que regulan y en la diferente localización subcelular que presentan.

Las PTPs de tipo receptor, presentan dominios extracelulares con homología con otras proteínas conocidas (fibronectina tipo III, anhidrasa carbónica, inmunoglobulinas, entre otras). Los dominios intracelulares presentan una marcada homología de secuencia entre los miembros del grupo. Otra característica de las PTPs de tipo receptor es que poseen dos dominios de tirosina fosfatasa consecutivos, siendo sólo uno de ellos el que presenta actividad enzimática significativa (Barford, 1995). El dominio no catalítico podría tener un rol en la localización subcelular de estas PTPs, dirigiéndolas a los compartimientos celulares específicos donde la concentración efectiva de sustrato es alta (Andersen y col., 2001).



**Figura 2. Clasificación y estructura de proteínas con actividad de tirosina fosfatasa.** Extraído de: Protein tyrosine phosphatases in signaling. Streuli M. Curr Opin Cell Biol. 1996 Apr;8(2) pág 183. Review.

Las PTPs de tipo no receptor se caracterizan por presentar un único dominio catalítico flanqueado en su región N-terminal por dos dominios SH2, que dirigen la asociación directa de estas enzimas con proteínas fosforiladas en tirosina. Este tipo de proteínas contienen secuencias de marcada homología con distintas proteínas tales como la proteína de eritrocito banda 4.1. Además pueden presentar dominios de interacción con otras proteínas como por ejemplo los dominios PEST, ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina, y dominios que dirigen a la proteína al núcleo o al retículo endoplasmático (Stoker, 2005; Tonks, 2006).

Con respecto a la estructura del dominio catalítico, éste consta de una secuencia de aproximadamente 240 aminoácidos que contiene al menos 6 regiones altamente conservadas. Particularmente importante es una secuencia de 11 aminoácidos: ile/his-cys-xaa-ala-gly-xaa-xaa-arg-ser/thr-gly, que está involucrada directamente en la catálisis (Fischer y col., 1991). En esta secuencia es relevante la presencia del aminoácido cisteína ya que éste participa, a través de su grupo tiol, en la formación de un intermediario tiofosfato (Zhang y Dixon, 1994). Esta característica estructural explica por qué todas las tirosina fosfatasas se inhiben por los agentes oxidantes que modifican el grupo tiol.

#### -Regulación de la actividad de PTPs

La actividad de las PTPs está controlada en forma precisa por distintos mecanismos, fundamentalmente a través de modificaciones post-traduccionales y/o interacciones proteína-proteína que modulan la actividad a través del control de la localización subcelular.

Debido a la presencia de variados dominios extracelulares, se postula que la regulación de la actividad de las PTPs de tipo receptor está mediada por la interacción con algún ligando específico. A pesar de que se han descrito varias interacciones entre estas proteínas y ligandos (Beltran y Bixby, 2003; Stoker, 2005; Yang y col., 2005), son pocos los casos donde se ha observado que esta interacción tenga un efecto sobre la actividad enzimática (Meng y col., 2000) ya que cuando se evalúa la actividad de estas PTPs solubilizadas y purificadas, se observa que despliegan considerable actividad frente a sustratos artificiales. Este hecho sugiere que estas PTPs pueden ser constitutivamente activas *in vivo* y que la interacción con ligandos podría producir la inhibición de la actividad de tirosina fosfatasa (Daum y col., 1991; Fukada y col., 2006), o la modulación de la actividad a través del control de su localización en la membrana plasmática, restringiendo así su interacción con el sustrato o con otros factores regulatorios (Zeng y col., 1999).

Al igual que lo que ocurre con los RTKs, la dimerización también parece ser un mecanismo regulatorio de la actividad de las PTPs de tipo receptor (Lee y col., 2007). Se ha visto que muchas de estas proteínas forman dímeros y

que esta dimerización puede también bloquear la actividad catalítica de estas enzimas (Bilwes y col., 1996).

Con respecto a los mecanismos post-traduccionales de regulación, es bien conocido que un gran número de PTPs están fosforiladas *in vivo*, lo cual sugiere que su actividad está controlada por eventos de fosfo/desfosforilación. La fosforilación tanto en residuos de tirosina como de serina/treonina es uno de los mecanismos más relevantes en la regulación de la actividad de las PTPs (Stoker, 2005; Tonks, 2006). Aunque en condiciones basales las PTPs exhiben marcada actividad, la fosforilación inducida por ligandos puede regular esta actividad por al menos dos mecanismos diferentes: por modificar los parámetros cinéticos y/o por dirigir la interacción con su ligando (Garton y Tonks, 1994; Wang y col., 1999; Stoker, 2005).

Con respecto a la fosforilación de PTPs en residuos de tirosina se ha observado que, en distintos sistemas, la insulina a través de la activación de su receptor fosforila a dos fosfatasa citosólicas: PTP1B (Tao y col., 2001) y PTP1C (Uchida y col., 1994), incrementando así su actividad. La activación de estas PTPs por fosforilación permite regular negativamente la acción de la insulina (Seely y col., 1996; Bandyopadhyay y col., 1997). PTP1C también se fosforila en tirosina y se activa en respuesta a citoquinas y factores de crecimiento y esta activación controla las señales proliferativas disparadas por estas moléculas (Valentino y Pierre, 2006; Bentires-Alj y Neel, 2007).

Con respecto a la regulación mediada por fosforilación en residuos de serina/treonina, está descrito que PKA y PKC fosforilan a PTP1B *in vitro* en varios residuos de serina y que esta modificación reduce la actividad enzimática (Flint y col., 1993; Chen y col., 1994). El grado de fosforilación en serina de PTP1B se altera a lo largo del ciclo celular *in vivo*, observándose incremento de la fosforilación durante la mitosis (Schievella y col., 1993). Otra tirosina fosfatasa que se regula por fosforilación es PTP1C. Esta enzima es fosforilada en serina por acción de PKC y esta modificación inhibe su actividad (Brumell y col., 1997).

PTP1D es una tirosina fosfatasa de tipo no receptor que también es regulada por fosforilación. En este caso se ha documentado la fosforilación tanto en residuos de serina/treonina (Rocchi y col., 2000) como de tirosina (Ali y Ali, 2000).

La fosfatasa CD45, una PTP de tipo receptor con una función relevante en el sistema inmune, es otro ejemplo de fosfatasa regulada por fosforilación en serina/treonina. En este caso, la fosforilación en serina aumenta la actividad de la enzima (Wang y col., 1999).

La actividad enzimática de las PTPs también es susceptible de regulación por oxidación del grupo tiol de la cisteína del sitio activo. Como se mencionó previamente, este aminoácido es esencial para la actividad catalítica. Se ha descrito que ciertos estímulos que promueven la fosforilación en tirosina, a través de activación de los RTKs, producen radicales libres que oxidan el grupo tiol. Este efecto causa la inhibición de las PTPs y contribuye a mantener el nivel de fosforilación en tirosina disparado por el estímulo (Rhee y col., 2003).

#### **I.5.2.b. Fosfatasas de actividad dual (DSPs)**

Las fosfatasas de actividad dual (DSPs) son enzimas capaces de desfosforilar tanto residuos de tirosina como de serina/treonina. Esta familia está compuesta por varios subgrupos, de los cuales el más relevante en el contexto de este trabajo es el grupo de las MAP quinasas fosfatasas (MKPs), enzimas que catalizan la desfosforilación de los miembros de la familia de las MAPKs (Dickinson y Keyse, 2006).

En mamíferos se han identificado y caracterizado varios miembros de la familia de las MKPs que se subdivide en dos grupos: el primero, tipificado por MKP-1, comprende enzimas nucleares rápidamente inducibles por factores de crecimiento o señales de estrés (Keyse y Emslie, 1992; Rohan y col., 1993). El segundo, tipificado por MKP-3, incluye predominantemente enzimas citosólicas cuyos transcriptos son inducidos por estímulos específicos, pero no por estrés ambiental (Groom y col., 1996; Dowd y col., 1998). Es importante destacar que la clasificación de estas fosfatasas según la localización subcelular puede variar de acuerdo a hallazgos recientes. Sustenta esta hipótesis el hecho de que se ha descrito la presencia de MKP-1 en mitocondrias (Rosini y col., 2004).

Nombre	Peso molecular (kDa)	Distribución tisular	Localización subcelular
VHR	20,5	Ubicua	?
PAC-1	34,4	Tejidos hematopoyéticos, cerebro	Núcleo
MKP-1 (CL100, 3CH134, ERP)	39,3	Pulmón, hígado, placenta, músculo esquelético, páncreas, corazón	Núcleo
MKP-2 (hVH2, TYP1)	42,9	Ubicua	Núcleo
MKP-3 (rVH6, Pyst1)	42,3	Corazón, cerebro, bazo, pulmón, músculo esquelético, riñón, hígado, páncreas, placenta	Citosol
B59	40,5	Corazón, pulmón, hígado, cerebro, riñón, páncreas, músculo esquelético, placenta	?
MKP-4	41,9	Riñón, placenta	Citosol > Núcleo
hVH3 (B23)	42,1	Cerebro, páncreas, hígado, placenta, pulmón, corazón, riñón, músculo esquelético,	Núcleo
M3/6 (hVH5)	68,8 (65,7)	Ojo, cerebro, pulmón, corazón, músculo esquelético	Núcleo y citosol

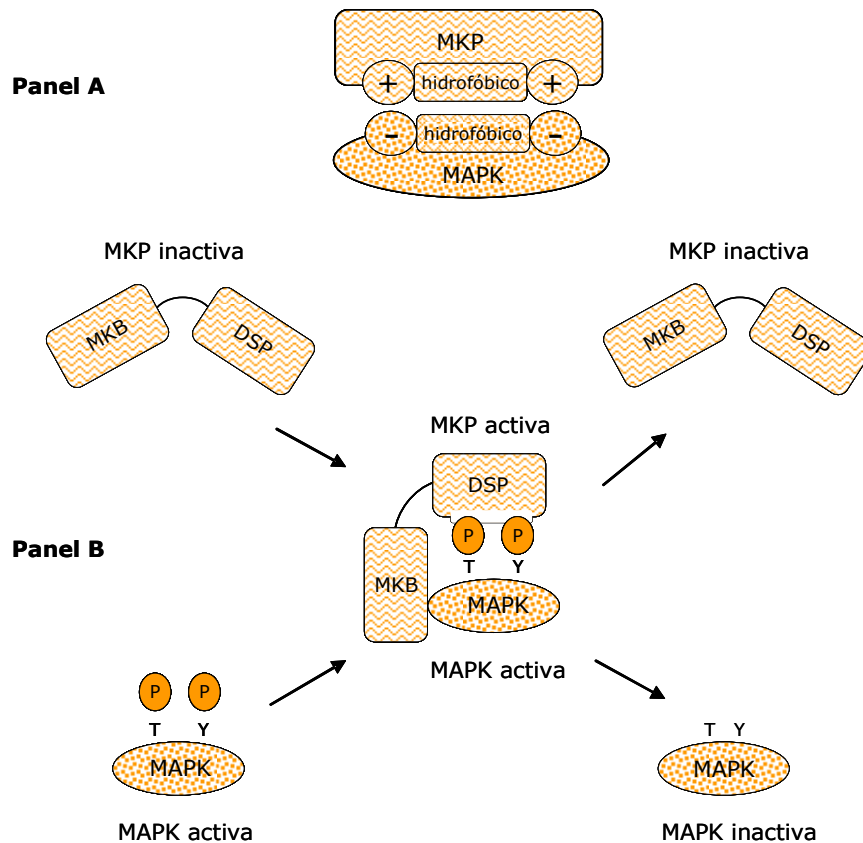
**Tabla 1. Características generales de las distintas MKPs.** Extraído de: *Signaling networks and cell cycle control: the molecular basis of cancer and other diseases*; Gutkind JS, 1<sup>st</sup> ed. 2000, New Jersey: Humana Press, pág 167).

### -Estructura de las MKPs

Las MKPs tienen un peso molecular que varía entre 34 y 69 kDa. Están compuestas por dos dominios: el dominio catalítico con actividad de fosfatasa dual o dominio DSP (**Dual Specificity Phosphatase**) que se encuentra en la porción C-terminal y el sitio de unión a las MAPKs (MKB, **MAP Kinase Binding domain**) que se encuentra ubicado en la porción N-terminal. Con respecto al dominio catalítico existe una homología mayor al 80 % entre los distintos miembros de la familia de las MKPs. Este dominio está constituido por



aproximadamente 140 aminoácidos y posee una secuencia de 9 aminoácidos (his-cys-xaa-xaa-gly-xaa-xaa-arg-ser) involucrada en la catálisis. El dominio MKB contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente, responsables de la interacción de las MPKs con su sustrato (Kelly y Chu, 2000).



**Figura 3. Interacción de las MKPs con las MAPKs.** Panel A: Esquema de la interacción de las MAPKs con las MKPs a través de los sitios de anclaje presentes en ambas proteínas. Panel B: Representación esquemática de la activación de las MKPs por las MAPKs. La unión de la MAPK activada al dominio MKB de la MKP induce cambios conformacionales en el dominio DSP que aumentan la actividad catalítica de la fosfatasa. Extraído de: Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. Kondoh K, Nishida E. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1773(8):1227-37.

Debido a que el sitio DSP no muestra selectividad estricta para con los miembros de la familia de las MAPKs, el dominio MKB juega un rol fundamental en la regulación de la especificidad de sustrato a través de interacciones de anclaje con las MAPKs. Este dominio posee aminoácidos

cargados positivamente incluidos dentro de una región hidrofóbica (Tanoue y col., 2002). A través de esta secuencia el MKB puede unirse a un sitio de anclaje en la MAPK que presenta un grupo de aminoácidos cargados negativamente, separados también por una región hidrofóbica (Kondoh y Nishida, 2007) (Figura 3, panel A). Más aún, se ha demostrado que varias MKPs son catalíticamente activadas por la unión al sustrato a través de su dominio MKB (Farooq y col., 2003; Castelli y col., 2004). La unión de la MAPK fosforilada al MKB altera la estructura del DSP. Este cambio conformacional junto con la interacción del dominio catalítico con la MAPK, causa un incremento en la actividad catalítica de MKP-3 (Zhou y col., 2001) (Figura 3, panel B).

#### -Especificidad de sustrato de las MKPs

Se han llevado a cabo numerosos estudios para analizar la especificidad de sustrato de las MKPs, muchos de los cuales consisten en la expresión de proteínas recombinantes y la medición de la actividad de fosfatasa *in vitro* de estas proteínas. Si bien se han utilizado diferentes métodos para establecer esta relación, en todos los casos se generan conclusiones similares: trabajando con altas concentraciones de enzima, las fosfatasas pierden su especificidad aparente. La capacidad de una dada MKP de interactuar a través de sitios específicos con una MAPK particular determina la especificidad de sustrato.

De acuerdo a la bibliografía, cada MKP aparenta tener cierta preferencia por un dado sustrato (Tabla 2). Por ejemplo, la fosfatasa MKP-1 es capaz de desfosforilar *in vitro* a los tres grupos más importantes de MAPKs (Groom y col., 1996), aunque en condiciones fisiológicas muestra preferencia por JNK y p38 (Franklin y Kraft, 1997). La proteína MKP-3 desfosforila preferentemente a ERK1/2 (Nichols y col., 2000).

Los factores determinantes de la especificidad de las MKPs no parecen derivar de la comparación de las secuencias lineales correspondientes. Probablemente, tras el análisis de las estructuras tridimensionales de estas enzimas se obtengan las claves moleculares para determinar la preferencia

por algún sustrato en particular. Las distintas especificidades de sustrato, junto con diferencias en la localización subcelular, distribución tisular y mecanismos de inducción proveen medios únicos de regulación de las vías de las MAPKs en respuesta a los múltiples procesos de activación.

<b>MKP</b>	<b>ERK</b>	<b>JNK/SAPK</b>	<b>p38</b>
VHR	-	?	?
PAC1	++	-	+
MKP-1	++	++	++
MKP-2	++	++	+/-
MKP-3	+++	+	+/-
B59	++	?	?
MKP-4	+++	+	+
hVH3	++	?	?
M3/6	-	+++	+++

**Tabla 2: Especificidad de sustrato de las MKPs** (extraído de: Signaling networks and cell cycle control: the molecular basis of cancer and other diseases; Gutkind JS, 1<sup>ra</sup> ed. 2000, New Jersey: Humana Press; pág 170–171).

### -Regulación transcripcional y post-traducciona l de las MKPs

Una de las características de las MKPs nucleares es su rápida inducción transcripcional por factores de crecimiento o distintos tipos de estrés. Como ejemplo se puede citar a la fosfatasa MKP-1, cuya expresión está regulada por múltiples efectores, tales como EGF (Ryser y col., 2002), ácido araquidónico (Metzler y col., 1998), estrés (Li y col., 1999), glucagon (Schliess y col., 2000) y glucocorticoides (Clark, 2003), entre otros. La fosfatasa PAC-1 es inducida por mitógenos en células B y T humanas (Rohan y col., 1993). MKP-2 es inducida por factores de crecimiento (Misra-Press y col., 1995) y ácido retinoico (Palm-Leis y col., 2004). En cuanto a las MKPs citoplasmáticas se puede mencionar a MKP-3, que se expresa constitutivamente en algunos tipos

celulares y es inducible por factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico y el factor de crecimiento neuronal (Camps y col., 1998).

Existen diferencias entre las formas ubicuas 1, 2 y 3 en lo que respecta a la cinética de inducción. Mientras que MKP-1 se induce rápidamente, la inducción de MKP-2 y MKP-3 es más lenta, evidenciándose luego de 4 a 6 horas de estimulación.

Está documentado que algunos miembros de la familia de las MKPs se regulan también a nivel post-traducciona. En particular se ha descrito la fosforilación de MKP-1 y MKP-3 por acción de ERK1/2. Esta fosforilación no modifica sustancialmente la actividad enzimática pero sí altera la vida media de la proteína (Brondello y col., 1999). En el caso de MKP-1 la fosforilación estabiliza la proteína, mientras que lo contrario ocurre con la fosforilación de MKP-3 (Brondello y col., 1999; Marchetti y col., 2005).

## **II. ESTEROIDOGÉNESIS Y SU CONTROL HORMONAL**

Las hormonas esteroides controlan funciones tan diversas como la diferenciación sexual, el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, la regulación del metabolismo de glúcidos y el mantenimiento del equilibrio hídrico, entre otras. La síntesis de hormonas esteroides es un proceso que ocurre en la glándula adrenal, gónadas, placenta y sistema nervioso central.

Las hormonas esteroides derivan de un precursor común, el colesterol, y poseen una estructura similar. Están agrupadas en cinco categorías: progestágenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos.

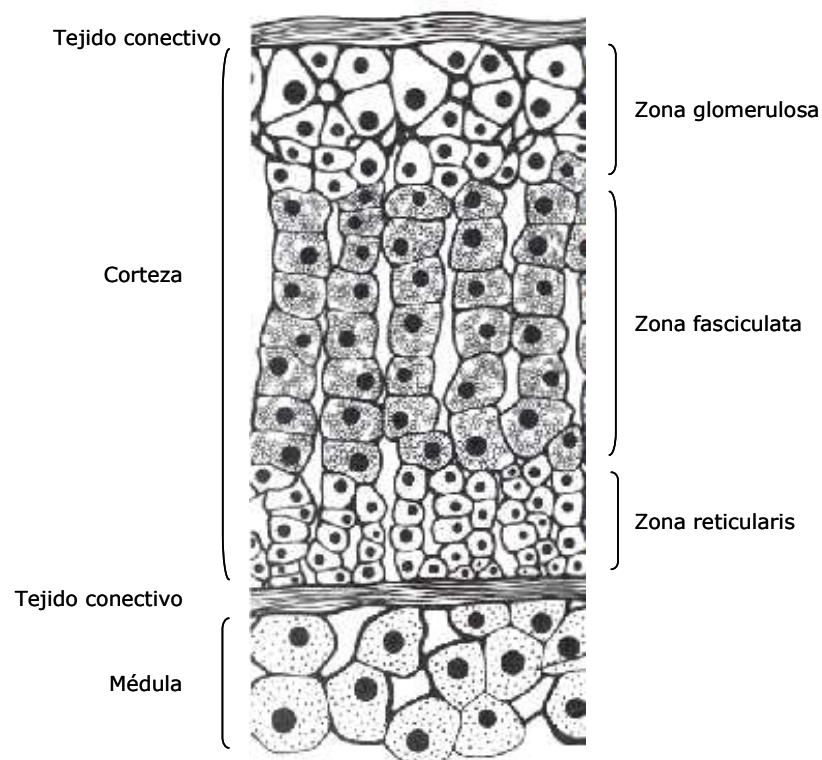
El control de la síntesis de esteroides en la corteza adrenal y en las gónadas es ejercido principalmente por un grupo de hormonas proteicas de origen hipofisario. En las células de la *pars distalis* de la adenohipófisis se sintetizan la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH) y un grupo de hormonas que derivan de un precursor común, llamado proopiomelanocortina (POMC) (Eipper y col., 1976). El procesamiento del POMC genera adrenocorticotrofina (ACTH),  $\alpha$ - y  $\beta$ -melanocito estimulante (MSH),  $\beta$ -lipotrofina (LPH) y  $\beta$ -endorfinas. Las hormonas FSH, LH y ACTH regulan la producción de hormonas esteroides en sus órganos blanco: ovario, testículo y glándula adrenal respectivamente.

### **II.1. Tejidos productores de esteroides**

#### **-Glándula adrenal**

Las glándulas adrenales de los mamíferos son estructuras pares que se localizan en el polo superior de los riñones. Si se secciona la adrenal según un plano longitudinal se advierten, además de una cápsula de tejido conectivo que rodea todo el órgano, dos regiones distintas: una periférica denominada corteza, que comprende entre el 80 y 90% de la glándula y una central denominada médula (Figura 4).

La corteza adrenal se divide en tres zonas: zona glomerulosa (ZG), zona fasciculata (ZF) y zona reticularis (ZR). La ZG es la más periférica y se extiende hacia adentro respecto de la cápsula, la zona intermedia es la ZF y la más interna de las tres es la ZR (Figura 4). La hormona ACTH controla el crecimiento y la actividad endócrina de la corteza adrenal. En la corteza se realiza la síntesis de hormonas esteroideas, principalmente de dos grupos: los mineralocorticoides y los glucocorticoides. Las células de la ZG producen mineralocorticoides (de los cuales la aldosterona es el más importante) (Scholer y col., 1973; Fraser y col., 1979) en respuesta a la concentración extracelular de  $K^+$ , ACTH y principalmente por el sistema renina-angiotensina (Davis y Garren, 1968). Las ZF y ZR actúan como una unidad en lo que se refiere a biosíntesis de esteroideas con acción glucocorticoidea y androgénica y están sujetas al control por ACTH. El glucocorticoide predominante en humanos es el cortisol, en tanto que en roedores predomina la corticosterona.



**Figura 4. Representación esquemática de un corte histológico de la glándula adrenal.** La glándula adrenal está constituida por una capa exterior de tejido conectivo, y tres zonas definidas: zona glomerulosa, zona fasciculata y zona reticularis. La médula adrenal está separada de la corteza por otra capa de tejido conectivo y está formada principalmente por células cromafines productoras de catecolaminas y opioides endógenos.

-Testículo

El testículo es un órgano encapsulado que, en la mayoría de los casos, se encuentra ubicado en el saco escrotal y está compuesto por una serie de túbulos separados por una trama de tejido intersticial. Histológicamente, el túbulo seminífero está constituido por diferentes tipos celulares: las células de Sertoli y las células germinales que darán origen a los espermatozoides (Fawcett, 1975). El espacio entre los túbulos adyacentes está ocupado por el tejido intersticial. Las células de Leydig constituyen el tipo celular más específico de este espacio. La función principal de estas células es la de sintetizar y secretar andrógenos, que regulan la espermatogénesis y desarrollan y mantienen todo el tracto genital masculino y las características sexuales externas (Mooradian y col., 1987).

Las gonadotrofinas hipofisarias son las principales reguladoras de la función testicular, en particular la FSH junto con los andrógenos que actúan sobre las células de Sertoli y la LH que tiene su acción sobre las células de Leydig.

-Otros tejidos productores de esteroides

Otros tejidos productores de esteroides son el ovario y la placenta. Más recientemente se ha descrito la síntesis de hormonas esteroides en el sistema nervioso central.

El ovario sintetiza y secreta distintas hormonas esteroides a lo largo del ciclo sexual femenino (estrón, estradiol y progesterona). El crecimiento y la maduración de los folículos ováricos y la producción de estrógenos están sostenidos por la FSH. El principal esteroide producido por el folículo ovárico es el  $17\beta$ -estradiol. El cuerpo lúteo produce y libera a sangre progesterona en respuesta a LH. En caso de ocurrir la fertilización e implantación, la gonadotrofina coriónica (CG) estimula la síntesis de progesterona, hasta que la producción de este esteroide por la placenta es suficiente para mantener la preñez.

La placenta no tiene un sistema completo para la síntesis de esteroides y depende del aporte de precursores provenientes del feto y de la madre para la producción de estrógenos y progesterona, los esteroides mayoritarios sintetizados por este tejido.

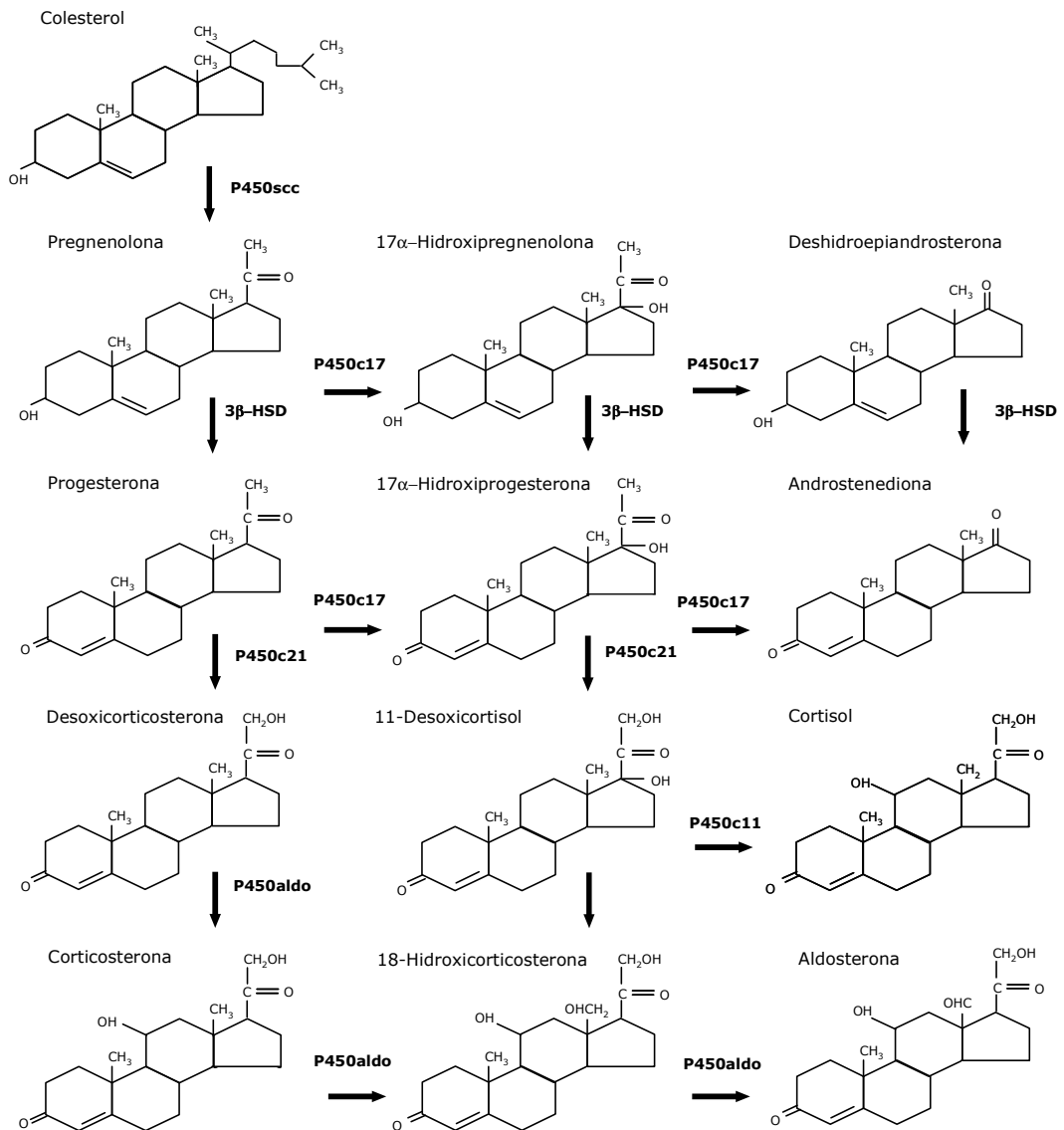
Se ha descrito que el cerebro tiene la capacidad de sintetizar hormonas esteroides (Baulieu, 1991). El colesterol utilizado en la neurosteroidogénesis proviene de la síntesis local (Dietschy y Turley, 2001), ya que las lipoproteínas que transportan el colesterol no atraviesan la barrera hematoencefálica. El colesterol es transformado a pregnenolona al igual que en los órganos periféricos y luego metabolizado a progesterona o dehidroepiandrosterona. A pesar de que la testosterona y el estradiol no eran considerados neuroesteroides, hoy se sabe que estas hormonas también se sintetizan en el cerebro (Steckelbroeck y col., 2001).

## **II.2. Biosíntesis de hormonas esteroides**

Como ya mencionamos, las hormonas esteroides se sintetizan a partir de un precursor común, el colesterol, un esteroide de 27 átomos de carbono. Las fuentes de colesterol son la ingesta y la síntesis, principalmente hepática e intestinal. Las vías de síntesis de las hormonas esteroides se muestran en el esquema de la Figura 5.

La primera etapa de la biosíntesis de hormonas esteroides consiste en la conversión de colesterol a pregnenolona (P5, un esteroide de 21 átomos de carbono), en la membrana mitocondrial interna. Esta reacción comprende dos hidroxilaciones sucesivas (en C-22 y C-20) y la escisión de la cadena lateral del colesterol y es catalizada por un complejo enzimático localizado en la membrana mitocondrial interna. Este complejo es denominado complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol, citocromo P450 (P450<sub>scc</sub>, **Side Chain Cleavage**). A partir de P5 se sintetiza la progesterona (P4). La reacción involucra la oxidación de hidroxilo del C3 de P5 a cetona, y la isomerización del doble enlace  $\Delta 5$  a  $\Delta 4$ . Estas reacciones son llevadas a cabo por la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), enzima localizada en el retículo endoplasmático.





**Figura 5. Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroides**

Los esteroides mayoritarios sintetizados en la glándula adrenal son los mineralocorticoides y los glucocorticoides. La enzima C-21 hidroxilasa cataliza la hidroxilación en C-21 de los esteroides P4 y 17α-OH P4, lo cual conduce a la formación de 11-desoxicorticosterona y 11-desoxicortisol respectivamente. A partir de estos esteroides se generan corticosterona y cortisol en una reacción catalizada por una enzima de la membrana mitocondrial interna, la 11β-hidroxilasa. La síntesis de aldosterona a partir de corticosterona ocurre mediante dos reacciones. La primera de ellas lleva a la formación de 18-

hidroximetilcorticosterona y seguidamente este compuesto es oxidado a la forma aldehído. La enzima que cataliza ambas reacciones es la C-18 hidroxilasa que también tiene actividad oxidasa y existe casi exclusivamente en la zona glomerulosa, por lo tanto la producción de aldosterona se limita a esta zona. Otros esteroides sintetizados en la corteza adrenal son los andrógenos, dehidroepiandrosterona, androstenediona, testosterona.

Los esteroides mayoritarios sintetizados en las gónadas son los andrógenos androstenediona y testosterona, y los estrógenos estradiol y estrona. Los andrógenos contienen 19 átomos de carbono, mientras que los estrógenos 18. Éstos se sintetizan a partir de los primeros por pérdida del grupo metilo angular C-19 y la formación de un anillo aromático, reacción que realiza la enzima aromatasa. Los andrógenos androstenediona y testosterona son transformados a los estrógenos estrona y estradiol respectivamente.

### **II.3. Cascada de señalización de las hormonas esteroideogénicas**

ACTH y LH ejercen su acción mediante un mecanismo que se inicia con la unión a sus receptores de la membrana plasmática (Cooke y col., 1976; Podesta y col., 1978). Ambas hormonas se unen a receptores específicos de la familia de los 7TMS y promueven un aumento de los niveles intracelulares de AMPc y la activación de la PKA (Cooke y col., 1976; Dufau y col., 1977; Podesta y col., 1978; Podesta y col., 1979; Sala y col., 1979) y consecuentemente, la fosforilación en serina/treonina de proteínas regulatorias. De esta manera se desencadena la respuesta celular específica, el incremento de la síntesis y secreción de hormonas esteroides.

La regulación aguda y crónica de la función adrenal por ACTH está básicamente mediada por proteínas fosforiladas por la acción de PKA (Rae y col., 1979; Schimmer, 1995), sin embargo la hormona también promueve la activación de otras proteínas quinasas. En células adrenocorticales bovinas se ha demostrado que el tratamiento con ACTH resulta en un aumento de la actividad de PKC que depende del tiempo y de la dosis (Vilgrain y col., 1984). Se ha postulado que este incremento de la actividad de PKC estaría vinculado con una translocación de las isoformas de PKC desde la membrana a la

fracción soluble (Vilgrain y col., 1984). También se ha descrito que ACTH incrementa la actividad de la proteína quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina en células adrenocorticales de rata (Carsia y col., 1982).

Muchos aspectos relacionados con el mecanismo de acción de ACTH y la regulación de la esteroidogénesis se conocen a partir de los estudios realizados utilizando como modelo experimental a las células adrenocorticales de la línea Y1 (Yasumura y col., 1966). Estas células se comportan como las células normales de la glándula adrenal de ratón en muchos aspectos, y están ampliamente aceptadas como modelo de estudios de la regulación hormonal de la esteroidogénesis adrenal. En el citoesqueleto de células adrenocorticales normales y de la línea Y1 se ha identificado una quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina muy activa. Al utilizar inhibidores de calmodulina se observó la inhibición de la esteroidogénesis y de la actividad de la quinasa, ambas con similar  $\text{EC}_{50}$ , lo cual sugiere que la actividad de esta quinasa podría estar involucrada en la regulación de la esteroidogénesis (Papadopoulos y col., 1990).

La hormona FSH ejerce su acción mediante un mecanismo similar al descrito para ACTH y LH, involucrando también la activación de la PKA (Hansson y col., 1999).

La regulación de la síntesis de mineralocorticoides por Angiotensina II, en cambio involucra un mecanismo dependiente de la activación de PKC (Foster, 2004).

#### -Activación de MAPKs por hormonas esteroidogénicas

ACTH también promueve la activación de varios miembros de la familia de las MAPKs en células adrenocorticales. Tanto en la corteza adrenal de rata como en células Y1, la hormona ACTH promueve la activación de JNK a través de un mecanismo dependiente de PKC y de  $\text{Ca}^{2+}$  (Watanabe y col., 1997). Los autores han postulado que esta activación estaría involucrada en la expresión de genes responsables de la respuesta celular a situaciones de estrés.

También se ha demostrado que en células adrenales de la línea Y1, ACTH produce la activación de ERK1/2, evento detectado a los pocos minutos de la estimulación hormonal (Le y Schimmer, 2001). El mecanismo por el cual

ACTH promueve la activación de ERK1/2 es independiente de PKA, ya que en células Kin-8, mutantes derivadas de la línea Y1 que no expresan la subunidad catalítica de PKA, ACTH aún es capaz de provocar la activación de las ERKs (Le y Schimmer, 2001).

El mecanismo de acción de LH también involucra la activación de ERK1/2. En gran medida los estudios realizados con relación a este tema, como muchos relacionados con la regulación hormonal de la esteroidogénesis, fueron realizados empleando como modelo experimental células de Leydig de la línea MA-10. En este tipo celular, como también en células de Leydig de rata, se ha demostrado que la estimulación con LH produce la activación de ERK1/2 a través de un mecanismo que requiere la actividad de la proteína Ras. A diferencia de la activación de ERK1/2 por ACTH, este mecanismo es dependiente de PKA (Hirakawa y Ascoli, 2003; Manna y col., 2007).

#### **II.4. Regulación hormonal de la síntesis de esteroides**

La regulación de la esteroidogénesis es un proceso complejo, aún en debate en algunos aspectos, con componentes comunes a todos los sistemas productores de esteroides. Si bien pueden existir ligeras diferencias en la cascada de señalización de cada hormona esteroidogénica, todas ellas convergen en la fosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina. El incremento en la síntesis de esteroides en respuesta a la acción hormonal es estrictamente dependiente de la fosforilación en residuos de treonina específicamente. Esta conclusión surge de experimentos en los que se ha evaluado la producción de esteroides de células esteroidogénicas que, previamente a ser estimuladas, se han incubado con análogos no fosforilables de los aminoácidos serina o treonina (Green y Orme-Johnson, 1991; Stocco y Clark, 1993).

La acción de las hormonas esteroidogénicas desencadena efectos que se detectan a los pocos minutos y efectos crónicos de detección más tardía. Entre los efectos de ocurrencia tardía se encuentra la inducción de la transcripción de genes que codifican para enzimas esteroidogénicas (Simpson y col., 1991). Sin embargo, si bien este efecto mantiene la producción de esteroides a largo

plazo, no es la causa de la respuesta esteroideogénica aguda, ya que se ha demostrado que el nivel de enzimas permanece constante en esta etapa (Koritz y Kumar, 1970).

En el proceso de síntesis de esteroides, la reacción que limita la vía es la catalizada por el complejo enzimático P450<sub>scc</sub> (conversión de colesterol a P5) (Karaboyas y Koritz, 1965). Sin embargo, la esteroideogénesis aguda no está limitada por la actividad catalítica del complejo enzimático P450<sub>sc</sub> en sí. Está bien demostrado que el paso limitante y hormonalmente regulado de la esteroideogénesis es el acceso del sustrato (colesterol) al sitio activo de la enzima P450<sub>scc</sub>, que se localiza en la membrana mitocondrial interna (Crivello y Jefcoate, 1980; Jefcoate y col., 1987).

En el transporte del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna, participan proteínas que son fosforiladas en respuesta al estímulo hormonal. En ausencia de estímulo hormonal, el transporte de colesterol a la mitocondria no ocurre en cantidades apreciables y la producción de esteroides está limitada. En concordancia con esta observación se verifica que ciertos derivados sintéticos del colesterol capaces de atravesar libremente las membranas mitocondriales, como el 22(R)-OH-colesterol, se metabolizan a P5 en ausencia de estímulo hormonal (Falke y col., 1975).

Además de la fosforilación de proteínas, otro evento también necesario para la estimulación aguda de la esteroideogénesis es la síntesis de proteínas. Esta conclusión deriva de experimentos realizados con inhibidores de la síntesis proteica como cicloheximida y puromicina. La adición de estos inhibidores a diferentes tiempos del estímulo esteroideogénico, permitió determinar que la síntesis de una proteína lábil es necesaria para la acción de las hormonas sobre la producción de esteroides (Garren y col., 1965; Davis y Garren, 1968; Garren y col., 1971; Simpson y col., 1991).

En base a lo expuesto se deduce que la acción aguda de las hormonas esteroideogénicas involucra un incremento en la velocidad del transporte intramitocondrial de colesterol, desde la membrana mitocondrial externa a la interna, que es dependiente de la fosforilación de proteínas y de la síntesis proteica. Este conocimiento motivó un cúmulo de trabajos con el objetivo de identificar la proteína lábil, dependiente de eventos de fosforilación que interviene en la regulación hormonal de la esteroideogénesis.

### **II.4.1. Proteínas involucradas en el transporte del colesterol**

El transporte de colesterol a través del espacio acuoso entre ambas membranas mitocondriales en células esteroideogénicas es un proceso que se ha investigado durante muchos años. Como resultado de estas investigaciones se han descrito varias proteínas como intermediarios obligatorios pero no suficientes en el mecanismo de acción de hormonas esteroideogénicas. Describiremos a continuación las más ampliamente caracterizadas.

#### **-Receptor periférico de benzodiazepinas (PBR)**

El receptor periférico de benzodiazepinas (PBR) es una proteína de la membrana mitocondrial externa de expresión ubicua. Sin embargo, en tejidos esteroideogénicos, los niveles de expresión de esta proteína son muy superiores a los observados en el resto de los tejidos (Anholt y col., 1985). El ligando endógeno de PBR es el inhibidor de unión al diazepam (**Diazepam-Binding Inhibitor**, DBI). El DBI, al igual que el PBR, está presente en numerosos tejidos, pero se expresa en altas concentraciones en células esteroideogénicas (Bovolín y col., 1990). El DBI y los agonistas de benzodiazepinas, al unirse a PBR, estimulan el transporte intramitocondrial del colesterol y la esteroideogénesis (Papadopoulos y Brown, 1995).

Se ha postulado que las hormonas tróficas alteran la afinidad de PBR por sus ligandos favoreciendo la entrada del colesterol a la membrana mitocondrial interna (Lacapere y Papadopoulos, 2003). La proteína PBR ha sido recientemente denominada TSPO (18 kDa) (**Translocator Protein**) (Papadopoulos y col., 2006), teniendo en cuenta su función. Este nuevo nombre se refiere sólo a la parte de 18 kDa que es la unidad funcional mínima de unión a los ligandos.

#### **-StAR (**S**teroidogenic **A**cute **R**egulatory protein)**

Los primeros trabajos que se realizaron para caracterizar el factor lábil necesario para la regulación de la esteroideogénesis, demostraron que varias fosfoproteínas de entre 37 y 30 kDa (pp37, pp32, pp30) se acumulan en

células de adrenal y de Leydig en respuesta a la estimulación hormonal (Krueger y Orme-Johnson, 1983; Pon y col., 1986). Posteriormente, se demostró que estas fosfoproteínas derivan de un precursor común de 37 kDa que se denominó StAR (Clark y col., 1994). StAR fue descrita como una proteína lábil, inducida hormonalmente, que presenta en su extremo amino terminal una secuencia de importación a la mitocondria (Stocco, 2001). El requerimiento de la proteína StAR para la esteroidogénesis ha quedado fehacientemente demostrado (Lin y col., 1995).

La expresión de la proteína StAR está finamente regulada a nivel hormonal. Las hormonas ACTH y LH promueven tanto el incremento del ARNm de StAR, como la síntesis y fosforilación de la proteína (Clark y col., 1995; Stocco y col., 2001).

Con respecto a la regulación de la expresión del ARNm de StAR, se han descrito diversos factores involucrados en la transcripción. Tras el análisis de la secuencia promotora del gen, se han identificado regiones específicas para la unión de factores de transcripción. Uno de los más caracterizados es SF-1 (*Steroidogenic Factor-1*) (Stocco y Clark, 1996), cuya actividad transcripcional es regulada mediante mecanismos de fosfo/desfosforilación.

#### -Proteínas que controlan los niveles de ácido araquidónico intracelular

La liberación de ácido araquidónico (AA) es otro evento necesario para la regulación de la síntesis de esteroides, producido por la acción hormonal y regulado por fosfo/desfosforilación. Nuestro grupo ha caracterizado una nueva vía de liberación de AA intramitocondrial en células esteroidogénicas (Maloberti y col., 2002). En esta vía intervienen la acil-CoA sintetasa 4 (ACS4) (Kang y col., 1997) y una acil-CoA tioesterasa mitocondrial (Acot2) (Paz y col., 1994; Finkielstein y col., 1998). ACS4 es una enzima que utiliza preferentemente AA como sustrato, para formar araquidonoil-CoA. El araquidonoil-CoA es transportado a la mitocondria mediante su unión a DBI, donde es sustrato de Acot2, una enzima que se activa por fosforilación dependiente de PKA (Castillo y col., 2006). El ácido araquidónico intramitocondrial liberado -o sus metabolitos- estimulan el acceso de colesterol a la membrana mitocondrial interna mediante la inducción de la

expresión de StAR (Maloberti y col., 2005; Wang y col., 2006), aunque no se descarta que además pueda ejercer una acción directa sobre el transporte de colesterol (Castillo y col., 2006).

#### **II.4.2. Acción de ERK1/2 en la regulación de la esteroidogénesis**

En secciones anteriores se mencionó que en células adrenocorticales y de Leydig, la estimulación por la correspondiente hormona trófica conduce a la activación de ERK1/2. Se plantea entonces el interrogante de cuál es el papel funcional de la actividad de estas enzimas en la regulación hormonal de la esteroidogénesis. Se ha demostrado que el bloqueo de la activación de ERK1/2 promovida por AMPc inhibe la esteroidogénesis y la inducción de StAR en células adrenocorticales de la línea Y1 (Gyles y col., 2001). Los autores demostraron que la actividad de ERK1/2 es necesaria para la fosforilación del factor de transcripción SF-1, el cual interviene en la transcripción del gen que codifica para StAR. En células de Leydig de la línea MA-10 Manna y col. demostraron que la cascada de ERK también está involucrada en la expresión de StAR aunque puntualizan que esta actividad puede estimular o inhibir la expresión de StAR según el tipo de estímulo que origine su activación (Manna y col., 2007). Recientemente se ha demostrado que en células MA-10 la estimulación hormonal promueve la traslocación de ERK1/2 a la mitocondria donde cataliza la fosforilación de StAR en la serina 232 y que esta fosforilación es necesaria para la acción de StAR sobre el transporte de colesterol a la mitocondria (Poderoso y col., 2008).

En contraste con lo demostrado en células adrenocorticales y de Leydig, en otros sistemas productores de esteroides tales como las células de la granulosa, la activación de las ERKs inhibe la estimulación hormonal de la esteroidogénesis (Tajima y col., 2003).



### **III. PROTEÍNA FOSFATASAS DE CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS**

Las hormonas ACTH y LH regulan tanto la proliferación de sus células blanco como la producción de esteroides a través de un mecanismo básicamente mediado por eventos de fosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina. Dado que el grado de fosforilación de las proteínas depende del balance neto entre las actividades de proteína quinasas y proteína fosfatasas, la caracterización de los procesos de desfosforilación de proteínas en estos sistemas –incluyendo las enzimas y los correspondientes sustratos– merece ser analizada. Con respecto a las enzimas involucradas, estos estudios deben incluir no sólo a las serina/treonina fosfatasas, sino también a las fosfatasas duales y a las tirosina fosfatasas. Esta consideración se basa en el hecho de que la activación de serina/treonina quinasas como PKA/PKC puede desencadenar la fosforilación y modulación de la actividad de distintos tipos de fosfatasas.

#### **III. 1. Regulación y función de serina/treonina fosfatasas de células esteroideogénicas**

Los primeros trabajos relacionados con las fosfatasas de proteínas de células productoras de esteroides se focalizaron en las serina/treonina fosfatasas. Iyer y col. analizaron la regulación de PP1 en la corteza adrenal de rata. Demostraron que ACTH produce, en forma dependiente del tiempo y de la dosis, la fosforilación del Inhibidor 1, con su consecuente activación (Iyer y col., 1988). Estos resultados indican que los procesos de desfosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina, al menos los mediados por PP1, resultarían inhibidos por la acción de ACTH.

Los trabajos relacionados con las serina/treonina fosfatasas en células esteroideogénicas posteriores a los de Iyer y col. tenían como objetivo establecer el papel de estas enzimas en la regulación hormonal aguda de la esteroideogénesis. La estrategia para estos estudios consistió en evaluar la producción de esteroides en células estimuladas en presencia de inhibidores

de serina/treonina fosfatasas permeables, como el ácido okadaico y la caliculina A. Estos estudios demostraron que los compuestos mencionados impiden la acción de la hormona o el segundo mensajero sobre la producción de esteroides en células de ZG y de ZF de la corteza adrenal bovina, sugiriendo que la actividad de serina/treonina fosfatasas es un requerimiento de la acción hormonal sobre la producción de esteroides (Sayed y col., 1997). Consistentemente con este hallazgo, se demostró que los inhibidores mencionados bloquean la inducción de la proteína StAR por AMPc (Jones y col., 2000). Sin embargo, estos resultados son contradictorios con los que mostraron que la actividad de PP2A es inhibida por AMPc en células MA-10 (Poderoso y col., 2002). Es probable que el efecto del ácido okadaico y la caliculina A sobre la acumulación de StAR se deba a una acción de estos compuestos sobre la síntesis de proteínas en general, ya que se demostró que en células MA-10 la incubación con estos inhibidores disminuye marcadamente la incorporación de  $^{35}\text{S}$  en las proteínas (Poderoso y col., 2002).

### **III.2. Desfosforilación en residuos de tirosina inducida por ACTH**

Las primeras observaciones que vincularon a las proteínas fosforiladas en tirosina con los mecanismos de transducción de señales de las hormonas esteroidogénicas datan de principios de la década del 90. Se describió que la insulina inhibe la secreción de esteroides estimulada por ACTH en células adrenocorticales bovinas, efecto atribuible al menos en parte a un antagonismo entre la fosforilación en residuos de tirosina disparada por insulina y la fosforilación por PKA que desencadena ACTH (Klein y col., 1992).

Más recientemente, Han y Rubin analizaron el efecto de ACTH sobre el contenido de fosfotirosina en proteínas de células adrenocorticales de la línea Y1. Demostraron que ACTH promueve la rápida desforilación de la paxilina, una proteína del citoesqueleto, a través de un mecanismo dependiente de PKA (Han y Rubin, 1996). La estimulación de células esteroidogénicas en cultivo (particularmente las adrenocorticales) por las hormonas tróficas correspondientes, produce un cambio en la morfología celular. Las células

pasan de una morfología plana a una redondeada, a los pocos segundos de ser estimuladas. Las investigaciones de Han y Rubin mostraron que el pervanadato, un anión que inhibe la actividad de tirosina fosfatasas por su acción sobre el grupo tiol de las mismas, inhibe el efecto de ACTH sobre el redondeo de las células Y1 y sobre la desfosforilación de la paxilina. En base a estos resultados, se sugirió que la desfosforilación en tirosina inducida por ACTH involucra la activación de tirosina fosfatasas más que la inhibición de una proteína quinasa.

En células adrenocorticales bovinas, la estimulación con ACTH también produce la rápida desfosforilación en tirosina de la paxilina mediante un mecanismo dependiente de la acción de PKA (Vilgrain y col., 1998). En coincidencia con las investigaciones descritas, en nuestro laboratorio se demostró que en ZF de adrenal de rata, el tratamiento hormonal *in vivo* produce una reducción del contenido de fosfotirosina de proteínas endógenas, una de ellas identificada como la paxilina (Paz y col., 1999).

### **III.3. Actividad de tirosina fosfatasas de células esteroideogénicas**

Dadas las evidencias que demostraban que ACTH induce la desfosforilación en tirosina de la proteína paxilina, se evaluó si este evento es mediado por la activación de tirosina fosfatasas, como sugerían los trabajos de Han y Rubin. Con este objetivo se procedió a evaluar la actividad de tirosina fosfatasas en distintas fracciones subcelulares de ZF de adrenales de ratas tratadas con ACTH. Estos ensayos permitieron demostrar que el tratamiento con ACTH produce un incremento transitorio de la actividad de tirosina fosfatasas en la fracción citosólica mientras que no modifica significativamente la actividad en otras fracciones subcelulares (fracción nuclear, microsomal, mitocondrial) (Paz y col., 1999). La incubación *in vitro* de ZF de adrenal de rata con 8Br-AMPC (un análogo permeable del AMPc) también incrementó la actividad de tirosina fosfatasas, sugiriendo que este efecto es mediado por la fosforilación dependiente de PKA (Paz y col., 1999). Con el propósito de caracterizar las enzimas que son moduladas por acción de ACTH/AMPC y que dan cuenta del incremento de la actividad total de tirosina

fosfatasa en la fracción citosólica, en el laboratorio se implementó una metodología que permite detectar proteínas con actividad de tirosina fosfatasa luego del análisis de las mismas mediante SDS-PAGE (Burridge y Nelson, 1995). El análisis de las proteínas citosólicas de ZF de adrenales de ratas (controles y tratadas con ACTH) permitió demostrar que ACTH promueve la activación de tres PTPs en la fracción citosólica de ZF de adrenales de rata, cuyos pesos moleculares son 115, 80 y 50 kDa respectivamente (Paz y col., 1999). Posteriormente se demostró que la fosfatasa de 115 kDa incrementa su actividad por fosforilación *in vitro* con PKA (Paz y col., 2000). En células de Leydig de la línea MA-10 también se ha descrito la activación, mediada por LH/hCG, de dos PTPs cuyos pesos moleculares son 110 y 50 kDa respectivamente (Paz y col., 2002).

En células adrenocorticales bovinas se ha identificado a PTP1D como una tirosina fosfatasa activada por ACTH/PKA (Rocchi y col., 2000). El hecho de que ACTH promueva la fosforilación dependiente de PKA y la activación de PTP1D en células adrenocorticales bovinas, sugiere que esta enzima podría ser un blanco de la acción de ACTH en ZF de adrenal de rata, aún cuando PTP1D se ha descrito como una proteína de 72 kDa (Rocchi y col., 2000). La fosforilación en serina/treonina es uno de los mecanismos que interviene en la regulación de PTPs, como mencionamos previamente. Por lo tanto, es probable que las PTPs que se activan por ACTH/AMPC se comporten como sustrato de PKA. Éste parece ser el mecanismo involucrado en la activación de la enzima de 115 kDa, ya que su actividad se incrementa por fosforilación *in vitro* con PKA y disminuye por incubación con fosfatasa ácida de papa (Paz y col., 2000).

En síntesis, nuestro grupo ha demostrado por primera vez que ACTH promueve un incremento en la actividad total de tirosina fosfatasa en ZF de adrenal de rata y que este incremento involucra la activación de varias PTPs que aún no han sido identificadas.

### **III.4. Papel funcional de la actividad de tirosina fosfatasas en células esteroideogénicas**

#### *-El papel del citoesqueleto en la esteroideogénesis*

Uno de los eventos más tempranos que ocurre en células esteroideogénicas en cultivo en respuesta a la estimulación hormonal es un cambio en la morfología celular (Lorenz y Mattson, 1986). Una de las proteínas que daría cuenta de este cambio en la morfología celular, al menos en células adrenocorticales, sería la paxilina. Por lo tanto, una o más PTPs activadas por ACTH/AMPc promoverían una reorganización del citoesqueleto a través de un mecanismo que incluye la desfosforilación de la paxilina.

Durante mucho tiempo se ha debatido acerca de la relación existente entre la arquitectura del citoesqueleto y la estimulación hormonal de la esteroideogénesis. Diversos estudios, en los que se han empleado diferentes modelos experimentales como cultivos primarios, líneas celulares, células en suspensión y de diferentes especies, han aportado conclusiones contradictorias con respecto a la relación entre los componentes del citoesqueleto y la esteroideogénesis. En algunos estudios realizados utilizando células adrenocorticales de la línea Y1 y adrenales de rata, se observó que la inhibición de la función de los microtúbulos provoca un incremento en la producción de esteroides, por lo que se sugirió que la remoción del esqueleto microtubular podría eliminar la barrera física entre las gotas lipídicas conteniendo colesterol y la mitocondria (Temple y Wolff, 1973; Ray y Strott, 1978; Sackett y Wolff, 1986). Otros estudios indican que tanto en células Y1 (Kotani y col., 1988), como en células de Leydig de rata (Saltarelli y col., 1984), los agentes antimicrotubulares estimulan la esteroideogénesis basal pero inhiben la esteroideogénesis inducida hormonalmente. Se postula que el incremento en la esteroideogénesis basal observado en células Y1 expuestas a estos agentes, podría deberse a los efectos de disrupción que producen los mismos sobre las membranas mitocondriales, lo cual facilitaría el transporte del colesterol al P450<sub>scc</sub> (Kotani y col., 1988). La inhibición sobre la esteroideogénesis estimulada hormonalmente, podría deberse a un efecto inhibitorio sobre la internalización del colesterol de la membrana plasmática o

proveniente de lipoproteínas provocado por los inhibidores (Nagy y Freeman, 1990).

Los estudios para establecer si los microfilamentos están relacionados con la acción de las hormonas esteroideogénicas sobre el transporte de colesterol y la esteroideogénesis también son contradictorios. Mientras que algunos trabajos demuestran que en células Y1 (Hall y col., 1979), adrenales de rata (Crivello y Jefcoate, 1978) y MA-10 (Nagy y Freeman, 1990), ciertos compuestos inhibidores de los microfilamentos inhiben la esteroideogénesis, otros describen que estos inhibidores estimulan la esteroideogénesis en células Y1 (Cortese y Wolf, 1978).

Por otro lado, se ha demostrado que en células de la línea Y1 (Almahbobi y Hall, 1990), células adrenocorticales de rata (Crivello y Jefcoate, 1978) y cultivos primarios de células de Leydig de rata (Almahbobi y col., 1993), una porción significativa de las gotas lipídicas se encuentra asociada a los filamentos intermedios. Se postula que las mitocondrias y las gotas lipídicas podrían estar asociadas estrechamente por conexiones a través de los filamentos intermedios, y que a través de estas conexiones el colesterol podría ser transportado a la mitocondria durante la esteroideogénesis. La disrupción de los filamentos provoca la alteración de la cubierta de vimentina o tubulina que cubre las gotas lipídicas y el acortamiento de la distancia entre la gota lipídica y la mitocondria incrementan la esteroideogénesis (Shiver y col., 1992).

Los estudios descriptos en cuanto a la participación de los diferentes componentes del citoesqueleto en la estimulación hormonal aguda de la esteroideogénesis no son coincidentes. Por lo tanto, hasta el presente no se puede inferir si la desfosforilación de la paxilina por las PTPs activadas por ACTH altera la magnitud de la respuesta esteroideogénica a la estimulación hormonal aguda.

#### -Inducción hormonal de la esteroideogénesis

Con el fin de conocer si la actividad de tirosina fosfatasa tiene una función en la estimulación hormonal de la esteroideogénesis, en nuestro laboratorio se evaluó la producción de esteroides de células estimuladas en presencia de compuestos que inhiben la actividad de tirosina fosfatasa

(pervanadato y óxido de fenilarsina) (Paz y col., 1999; Maciel y col., 2001). Se demostró que estos compuestos, en concentraciones que no inhiben la actividad de PKA, inhiben la esteroidogénesis estimulada por la hormona o por AMPc sin afectar la esteroidogénesis basal. En contraste, estos inhibidores no interfieren con la esteroidogénesis sostenida a partir de 22(R)OH-colesterol, un análogo permeable de colesterol que difunde libremente a la mitocondria sin requerir estímulo hormonal para su transporte. En síntesis, estos estudios demostraron que la regulación de la esteroidogénesis tanto por ACTH como por LH requiere de la acción de PTPs en un punto localizado luego de la activación de PKA previo al transporte del colesterol a la mitocondria (Paz y col., 1999; Maciel y col., 2001).

La respuesta aguda a las hormonas esteroidogénicas incluye la inducción mediada por PKA de la proteína StAR. Por lo tanto, dado que la inhibición de la actividad de tirosina fosfatasa impide la acción hormonal sobre la producción de esteroides, se analizó si la actividad de PTPs es necesaria para la expresión de StAR. Se demostró que los inhibidores de tirosina fosfatasas, en concentraciones que no afectan la síntesis proteica, reducen significativamente los niveles del ARNm y de la proteína StAR inducidos por AMPc en células de Leydig MA-10 y adrenocorticales de la línea Y1 (Paz y col., 2002; Poderoso y col., 2002), por lo que se concluye que la actividad de tirosina fosfatasa tiene un papel funcional en la esteroidogénesis por su acción a nivel de la inducción de la proteína StAR. Más aún, recientemente se demostró que la inhibición de la actividad de tirosina fosfatasa bloquea la inducción por AMPc de ACS4 y StAR y que este efecto puede ser revertido por el agregado de ácido araquidónico exógeno (Cano y col., 2006). La liberación de AA regulada hormonalmente interviene en la inducción de la proteína StAR, y este evento es regulado por ACS4. Dado que la inducción de ACS4 es es bloqueada por inhibidores de PTPs, podría postularse que la acción de estas tirosinas fosfatasas sobre la inducción de la proteína StAR, estaría mediada por la liberación de AA (Cornejo Maciel y col., 2005).

-Inducción de hidroxilasas involucradas en la síntesis de hormonas esteroides

Se ha demostrado que otro evento para el cual es relevante la actividad de tirosina fosfatasa es la expresión de hidroxilasas que intervienen en la biosíntesis de esteroides. Estas hidroxilasas son inducidas como parte de la regulación hormonal crónica. Los estudios realizados sobre la transcripción del gen hCYP17 -que codifica para la hidroxilasa P450c17- en células adrenocorticales humanas de la línea H295R indicaron que los inhibidores de serina/treonina y tirosina fosfatasas incrementan la unión del factor de transcripción SF-1 al promotor del gen, aumentando su actividad transcripcional (Sewer y Waterman, 2002). Incluso en trabajos posteriores, estos mismos autores demostraron que la actividad de fosfatasa también estaba involucrada en la expresión de otras hidroxilasas (Sewer y Waterman, 2003). En base a estos estudios, se sugirió que una fosfatasa de actividad dual dependiente de AMPc estaría involucrada en la regulación del factor de transcripción SF-1 (Sewer y Waterman, 2002).

En resumen, y en base a lo que se expuso en los dos últimos capítulos de esta Introducción, se puede señalar que la biosíntesis de hormonas esteroides es un proceso que presenta un mecanismo de transducción de señales complejo (Figura 6). Según se ha mencionado, la esteroidogénesis no sólo está regulada por proteína quinasas, sino por proteínas con actividad de tirosina fosfatasa. En vista de las importantes funciones señaladas para las fosfatasas de proteínas, resulta interesante abordar la caracterización de algunas de las que se inducen y/o activan por acción hormonal. En este contexto en esta Tesis Doctoral, se identificarán dos tirosina fosfatasas clásicas que se activan por ACTH en ZF de adrenal de rata y se estudiará la expresión de una fosfatasa dual, MKP-1, en células adrenocorticales y de Leydig. Este trabajo de Tesis Doctoral, más el estudio correspondiente a los sustratos de estas fosfatasas, permitirán determinar el rol funcional de estas proteínas en la biología de las células productoras de esteroides.



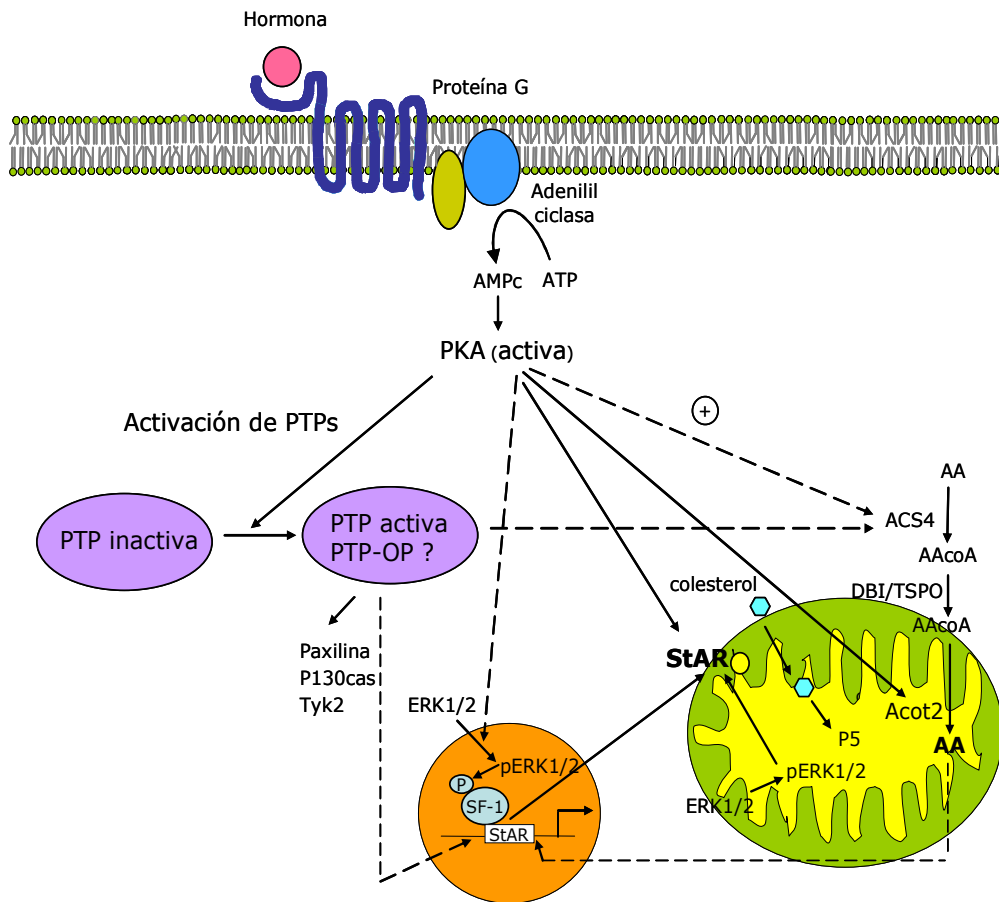


Figura 6. Visión general de la esteroidogénesis.

***OBJETIVOS***

---

Los antecedentes que establecen que las proteínas con actividad de tirosina fosfatasa -tanto las PTPs "clásicas" como las de actividad dual- cumplen importantes funciones biológicas, y que esta actividad enzimática está vinculada con la acción de las hormonas esteroideogénicas, subrayan la importancia de caracterizar este tipo de enzimas en sistemas esteroideogénicos.

En este trabajo, el interés se centró en identificar particularmente las PTPs que se activan por ACTH en zona fasciculata de adrenal de rata. En este sistema el incremento en la actividad total de tirosina fosfatasa se evidencia a los pocos minutos de la estimulación *in vivo* e *in vitro*. Este hecho, sumado a que al menos tres PTPs exhiben mayor actividad cuando provienen de muestras de animales tratados con ACTH, sugiere que esta hormona promueve la activación, más que la inducción, de tirosina fosfatasas de identidad no establecida.

Está bien documentado que las MAPKs participan en la acción trófica y endócrina de las hormonas esteroideogénicas. En relación a este último punto se conoce que en células adrenocorticales y de Leydig las correspondientes hormonas tróficas promueven la activación transitoria de MAPKs y que en particular la actividad de ERK1/2 es esencial para el transporte de colesterol, paso limitante de la esteroideogénesis. Estos conocimientos sugieren que las hormonas esteroideogénicas podrían regular la expresión y/o actividad de MKPs para ejercer un control espacio-temporal estricto sobre la actividad de las MAPKs, una hipótesis a analizar en este estudio. Este trabajo se focaliza en MKP-1 en particular, ya que por ser ésta una enzima preponderantemente nuclear se postula que modularía los eventos transcripcionales relacionados con las MAKPs. Uno de estos eventos podría ser la inducción hormonal de StAR.

En base a lo expuesto y para el desarrollo de este trabajo se fijaron los siguientes objetivos:

I- Caracterizar las tirosina fosfatasas activadas por ACTH/AMPC, empleando como modelo experimental la ZF de adrenal de rata. El plan contempla el análisis de los siguientes puntos:

*I.1 En relación a la PTP de 115 kDa (PTP115) se planea: 1) obtener una muestra parcialmente purificada para analizar aspectos regulatorios de la actividad enzimática y 2) determinar su identidad.*

*I.2 Con respecto a la PTP de 80 kDa se propone: 1) analizar si esta proteína es PTP1D, 2) determinar si es sustrato de PKA en reacciones de fosforilación "in vitro" y 3) analizar los efectos de la fosforilación sobre la actividad enzimática.*

II- Analizar la regulación de MKP1 en células esteroideogénicas (adrenocorticales de la línea Y1 y de Leydig de la línea MA-10) bajo diferentes condiciones que afectan la producción de esteroides. Este ítem incluye los siguientes objetivos particulares:

*II.1 Analizar el efecto hormonal sobre el nivel de expresión de MKP-1.*

*II.2 Estudiar el efecto del golpe de calor sobre la fosfo/desfosforilación de las MAPKs y sobre el nivel de expresión de MKP-1. Esta propuesta se basa en que este tipo de estrés interfiere con la expresión de StAR y la esteroideogénesis, especialmente en células de Leydig.*

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## **I. Reactivos**

La dexametasona (9-flúor-11 $\beta$ ,17,21-trihidroxi-16 $\alpha$ -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona) fue gentilmente provista por Ciba Geigy (Basilea, Suiza).

La hormona Adrenocorticotrofina (ACTH), fue provista por los Laboratorios Elea (Buenos Aires, Argentina).

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): 8Br-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (8Br-AMPC), ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), poli-glutámico-tirosina (pGT), adenosina trifosfato (ATP), fragmento 20-31 del factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor de EGF, subunidad catalítica de PKA (de corazón bovino), estándares de peso molecular para electroforesis, HEPES, clorhidrato de guanidina, ditioneitol (DTT), ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA), ácido etilén glicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetraacético (EGTA), imidazol, manitol, sacarosa, Tris, glicina, dodecil sulfato de sodio (SDS). N-[2-(p-bomocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), Sephadex G50, DEAE-celulosa, Temed™. El material plástico para cultivo se compró a Corning-Costar (Corning, NY, USA). Los medios de cultivo Waymouth MB732 y Ham-F10, Tripsina-EDTA, gentamicina, albúmina sérica bovina (BSA) y el reactivo Trizol™ se adquirieron a la empresa Gibco (Grand Island, NY, USA). El suero de caballo fue adquirido a GIBCO y el suero fetal bovino a la empresa Natocor (Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina).

Los anticuerpos utilizados fueron del siguiente origen: Anticuerpo específico anti MKP-1; Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, USA); anticuerpos contra pERK1/2 y JNK, Cell Signaling (Beverly, MA, USA), anticuerpos anti PTP1D, PTP-PEST,  $\beta$ -tubulina y ERK; Upstate Biotechnology (NY, USA), anticuerpos anti IgG de ratón y de conejo desarrollados en cabra y conjugados con peroxidasa, BioRad Laboratories (Hércules, California, USA).

Las membranas de PVDF, reactivos (acrilamida, bisacrilamida, y otros) y equipos de electroforesis (Mini-Protean II, equipos de transferencia y de secado de geles) también fueron provistos por BioRad Laboratories. La membrana Hybond™-N para transferencia de ácidos nucleicos y el reactivo de detección de Western blot por quimioluminiscencia (ECL), fueron adquiridos a GE Healthcare.

Se utilizaron los siguientes compuestos radioactivos de la empresa New England Nuclear (Boston, MA, USA): [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP, y [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP.

Las enzimas de restricción y diversos reactivos de biología molecular, fueron provistos por Promega (Madison, WI, USA). El resto de los reactivos comerciales utilizado fue de la mejor calidad disponible.

## **II. Animales**

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar (90 días de edad) de 200 a 250 gramos de peso, alimentadas con alimento balanceado y agua *ad libitum*. Las glándulas adrenales fueron obtenidas a partir de animales tratados con dexametasona (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en el agua de bebida durante las 16 horas previas al sacrificio (Podesta y col., 1979). La administración de dexametasona tiene como objetivo evitar las variaciones fisiológicas de los niveles de corticosterona debidas al ritmo circadiano y minimizar la producción de esteroides que genera el estrés de la matanza. La dexametasona, administrada por esta vía y en la dosis indicada, no afecta la estimulación de la esteroidogénesis adrenal. Los animales se sacrificaron por decapitación y se removieron las glándulas adrenales, que fueron mantenidas en hielo.

## **III. Líneas celulares**

Durante este trabajo se utilizaron como modelo de estudio dos líneas celulares tumorales esteroidogénicas de origen murino: las células adrenocorticales Y1 y las células de Leydig MA-10.

La línea de células adrenocorticales Y1, desarrollada por Yasumura y sus colaboradores (Yasumura y col., 1966) y caracterizada por Schimmer (Schimmer, 1979), fue obtenida partir de un tumor adrenocortical transplantable de ratón, LAF-1. Las células tumorales fueron clonadas luego de varios pasajes alternados entre el cultivo y el animal (Buonassisi y col., 1962). Estas células se comportan de manera similar a las células adrenales normales, excepto que los esteroides que producen son del tipo  $\Delta^4$ -3-ceto-C21-esteroides, principalmente 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y 11 $\beta$ -20 $\alpha$ -dihidroxiprogesterona (Pierson, 1967).

Las células Y1, gentilmente cedidas por el Dr. Bernard Schimmer (Universidad de Toronto, Canadá), se cultivaron en medio Ham-F10, suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado por calor,  $\text{NaHCO}_3$  1,2 g/l, penicilina 200 UI/ml y sulfato de estreptomicina 200  $\mu\text{g/ml}$ . Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en estufa húmeda, gaseada con 5% de  $\text{CO}_2$ .

La línea celular MA-10 fue originada a partir de un tumor transplantable murino, M5480P (Ascoli, 1981). Las células de Leydig del tumor se adaptaron al cultivo por pasaje alternado entre éste y el animal hospedador, y se clonaron luego de 5-6 subcultivos. Dos de los clones así obtenidos retienen la capacidad de unir LH/CG y responden a estas hormonas produciendo progesterona como esteroide principal (Ascoli, 1981).

Las células de la línea MA-10 fueron cultivadas en medio Waymouth MB752/1 conteniendo  $\text{NaHCO}_3$  1,12 g/l, HEPES 20 mM, gentamicina 50  $\mu\text{g/ml}$  y 15% de suero de caballo inactivado por calor, en estufa húmeda a 37 °C y gaseada con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Los experimentos efectuados utilizando tanto células Y1 como MA-10 se realizaron sobre cultivos preparados en pocillos de 6 cm de diámetro con una superficie de 20  $\text{cm}^2$  que se usaron luego de 3 o 4 días cuando se obtiene aproximadamente el 60-70% de confluencia.

#### **IV. Estimulación de glándulas adrenales *in vivo***

Luego del tratamiento con dexametasona, los animales se inyectaron con 200  $\mu\text{g}$  de ACTH por kg de peso por vía subcutánea, y se sacrificaron luego de 15 minutos de la inyección (Podesta y col., 1979). Las glándulas adrenales se extrajeron y se procesaron como se describe más adelante.

#### **V. Estimulación de células en cultivo**

##### **-Estimulación de células de la línea MA-10**

Luego de alcanzar el grado de confluencia apropiado, las células fueron arrestadas en fase G1 temprana del ciclo celular por depleción de suero



durante 24 horas. Luego de este período, las células se estimularon con 8Br-AMPC (1 mM). Al finalizar la estimulación, las células se lisaron (como se describe seguidamente) para obtener ARN y proteínas, para su análisis por Northern blot y Western blot respectivamente.

Como control de la estimulación se evaluó la cantidad de esteroides liberados al medio de incubación por radioinmunoensayo (Mendelson y col., 1975; Podesta y col., 1979).

#### -Estimulación de células Y1 y MA-10 por golpe de calor

Tras alcanzar el grado de confluencia apropiado, las células fueron arrestadas en fase G1 del ciclo celular por depleción de suero durante 24 horas. Luego de este período, las células se sometieron a un protocolo de golpe de calor, que consistió en una incubación durante 10 minutos a 45 °C, tras lo cual se efectuó una segunda incubación a 37 °C por diferentes tiempos (tiempo de recuperación, TR), de acuerdo con el experimento. A continuación se aisló el ARN total o las proteínas para su análisis por Northern blot y Western blot respectivamente.

### **VI. Obtención de lisados celulares**

Luego de los tratamientos correspondientes, se retiró el medio de cultivo y cuando fue necesario se conservó para dosar los esteroides producidos, como control de estimulación. Las células se lavaron con solución salina NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM (PBS; pH 7,4). y luego se lisaron. La lisis se realizó con una solución conteniendo Tris-HCl 20 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, NaCl 125 mM, Tritón 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasas (leupeptina 10 μM, pepstatina A 1 μM, PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (inhibidor de tirosina fosfatasas) 200 μM, NaF 50 mM y β-glicerol fosfato 40 mM), en una proporción que varió entre 100 y 300 μl/ pocillo. Las células se lisaron y la suspensión obtenida fue sometida a centrifugación (20 minutos, 900 x g, 4 °C). Luego de la centrifugación se recogió el sobrenadante que se utilizó para los experimentos que se describen posteriormente.

## **VII. Fraccionamiento subcelular de glándulas adrenales**

Todos los procedimientos que se indican fueron llevados a cabo entre 0-5 °C. Las glándulas adrenales obtenidas luego de la estimulación de los animales fueron decapsuladas y cortadas en cuartos. Luego se realizó la homogeneización en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón, utilizando una solución amortiguadora que se describe como apropiada para valorar posteriormente la actividad de tirosina fosfatasa (Tonks y col., 1988) en una relación de 0,2 ml/glándula. La composición de esta solución es la siguiente: imidazol 20 mM (pH 7,2), manitol 270 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasa (leupeptina 10 µM, pepstatina A 1 µM, PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 µM, NaF 50 mM y β-glicerol-fosfato 40 mM). Cuando el homogenato fue utilizado para valorar actividad de tirosina fosfatasa en solución, se omitió el agregado de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. El homogenato fue centrifugado a 400 x g durante 10 minutos con el fin de remover los núcleos y restos de células. El sobrenadante resultante se centrifugó a 9000 x g por 20 minutos para obtener la fracción mitocondrial (sedimento). El sobrenadante obtenido (sobrenadante post-mitocondrial) se centrifugó a 105000 x g durante 60 minutos, separándose la fracción particulada (sedimento) de la fracción citosólica (sobrenadante).

## **VIII. Purificación parcial de la tirosina fosfatasa de 115 kDa**

Para efectuar la purificación parcial de PTP115 se sacrificaron entre 25 y 30 ratas sin tratar con ACTH. En un experimento tipo, el citosol correspondiente a 60 adrenales rindió aproximadamente 35 mg de proteína citosólica, contenidos en un volumen de solución de entre 8-10 ml. Este material fue sometido a distintos pasos de fraccionamiento proteico como describimos a continuación. Todos estos procedimientos se realizaron a temperaturas entre 0 y 5 °C.

---

-Precipitación fraccionada con soluciones de saturación creciente de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El primer paso de purificación consistió en precipitar las proteínas citosólicas con soluciones de distinto grado de saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 30, 50, 70 y 90%. Se tomó el volumen total de la solución de proteínas citosólicas de ZF, y se le agregó lentamente en frío y con agitación una cantidad suficiente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para generar una solución al 30% de saturación. La agitación se prolongó durante 30 minutos, tras los cuales la muestra se centrifugó a 9000 x g durante 20 minutos. El precipitado se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de una solución amortiguadora de imidazol 20 mM pH 7,2. Al sobrenadante se le agregó la cantidad de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  necesaria para generar una solución saturada al 50% y se procedió tal como se indicó anteriormente. Los mismos pasos se repitieron para soluciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturadas al 70 y 90%.

Para remover las sales remanentes de la precipitación, se dializó la muestra durante 16 horas contra la solución utilizada para resuspender los precipitados. Luego del desalado, se analizaron las fracciones correspondientes a las soluciones con distinto grado de saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a través de ensayos de actividad de fosfatasa en geles (descritos más adelante). Estos ensayos permitieron determinar la fracción más conveniente para continuar con el proceso de purificación.

-Cromatografía de intercambio iónico

El paso siguiente consistió en un fraccionamiento en columna de intercambio iónico eluida con un gradiente discontinuo de NaCl. El volumen obtenido del dializado de la muestra (1,5 ml) se sembró en una columna de intercambio aniónico de DEAE-celulosa (volumen:2 ml), equilibrada con una solución de imidazol 20 mM pH 7,2. Se recogió el volumen que eluye durante la siembra (1,5 ml) y se lavó la columna con la solución de imidazol (tres veces). A continuación se hicieron eluciones sucesivas con soluciones de imidazol 20 mM pH 7,2 con NaCl en concentraciones crecientes. Se recogieron fracciones de 2 ml, que fueron dializadas contra la solución de imidazol.

Muestras conteniendo la cantidad de proteína adecuada en cada paso se analizaron por SDS-PAGE en geles para la detección de actividad de tirosina fosfatasa, con el fin de elegir la fracción adecuada para continuar. Luego, la proteína obtenida se filtró a través de filtros Amicon YM-100 con un punto de corte de 100 kDa. La proteína así semipurificada se utilizó para ensayos de actividad de tirosina fosfatasa (ensayos en geles y en solución).

### **IX. Ensayos de actividad de tirosina fosfatasa**

Para evaluar la actividad de las PTPs se efectuaron ensayos en los que se utiliza como sustrato un polímero sintético de ácido glutámico y tirosina fosforilado *in vitro* en tirosina: poli-glutámico- $^{32}\text{P}$  tirosina, pG $^{32}\text{P}$ T, como se describe seguidamente. Este sustrato se usó para ensayos de actividad en solución y en geles de bioactividad.

#### -Fosforilación de poli-glutámico-tirosina (pGT)

El sustrato pG $^{32}\text{P}$ T se obtuvo por fosforilación *in vitro* por acción del receptor de EGF activado por su agonista en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (actividad específica: 3000 Ci/mM) (Burrige y Nelson, 1995). La reacción de fosforilación se realizó en un volumen de 170  $\mu\text{l}$  de una solución conteniendo 0,3 mg de poli-glutámico tirosina (pGT), HEPES 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NaAc 12 mM,  $\text{MnCl}_2$  2 mM, DTT 2 mM, Tritón X-100 0,02%, ATP 0,1 mM,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  300  $\mu\text{Ci}$ , receptor de EGF 5U, EGF 500 nM. La reacción se prolongó durante 18-20 horas a 30 °C con agitación y se frenó por el agregado de 170  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético 20%. La solución se dejó en un baño con hielo durante 30 minutos y luego se centrifugó durante 20 minutos a 12000 x g. El sedimento fue disuelto en Tris 2 M (100  $\mu\text{l}$ ) (pH 8) y sembrado en una columna de Sephadex G-50 (35 cm de altura x 0,8 cm de diámetro) equilibrada con imidazol 50 mM, pH 7,2. Esta misma solución se utilizó para la elución, en la que se recogieron fracciones de 400  $\mu\text{l}$ . Para seleccionar la fracción conteniendo pG $^{32}\text{P}$ T, se cuantificó la radiactividad en cada fracción eluida en un contador  $\beta$  (Efecto Cherenkov). El pG $^{32}\text{P}$ T eluido,

usado como sustrato en los ensayos de desfosforilación, tuvo una actividad específica aproximada de  $2 \times 10^7$  cpm/mg.

-Ensayo de actividad de tirosina fosfatasa en solución

En este ensayo se evalúa la actividad de tirosina fosfatasa midiendo la liberación de  $^{32}\text{Pi}$  del pGT marcado radiactivamente en el seno de una solución apropiada. La muestra se incuba con el sustrato radiactivo (radiactividad ofrecida: 40.000-60.000 cpm/tubo) en una solución apropiada para la reacción de desfosforilación conteniendo imidazol 25 mM (pH 7,2), BSA 1 mg/ml y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % (Tonks y col., 1988). Luego de incubar durante 10 minutos a 30 °C se agregan 20  $\mu\text{l}$  de una solución de BSA 25 mg/ml como aporte de masa proteica para favorecer la posterior precipitación de las proteínas por el agregado de 80  $\mu\text{l}$  de TCA 20 %. Luego de incubar durante 5 minutos a 4 °C, se realiza una centrifugación de 5 minutos a 12000 x g para separar el precipitado proteico del sobrenadante. Posteriormente el sobrenadante conteniendo el Pi liberado se transfiere a un tubo para cuantificar la radiactividad debida al  $^{32}\text{Pi}$  en un contador de centelleo  $\beta$ . Con la metodología descrita, el radiactividad liberada ( $^{32}\text{Pi}$ ) en ausencia de enzima (blanco) fue rutinariamente menor al 5 % de la radiactividad total ofrecida.

Con esta metodología se evaluó la actividad de muestras provenientes de la purificación parcial de PTP115 de ZF de adrenales de rata. En particular, se analizaron las proteínas retenidas en los filtros Amicon YM-100 (punto de corte 100 kDa). Seguidamente, se determinó la actividad presente en diferentes alícuotas de muestra para determinar el volumen de muestra adecuado para el ensayo (0,5 a 2  $\mu\text{l}$ ). Luego la muestra se sometió a ensayos de fosforilación *in vitro* (fosforilación en frío) como se describirá posteriormente. A partir de la mezcla de reacción de fosforilación se tomó una alícuota equivalente al volumen óptimo establecido previamente para realizar el ensayo de actividad de tirosina fosfatasa. Como se quería determinar si la fosforilación afectaba los parámetros cinéticos de la enzima se procedió a realizar un análisis de la actividad en función de la cantidad de sustrato (pG[ $^{32}\text{P}$ ]T). Para realizar el gráfico de las inversas se calcularon los valores para la abscisa utilizando el número de cuentas de pG[ $^{32}\text{P}$ ]T, en lugar de la

concentración de sustrato. Esto se debe a que el PGT es un polímero con peso molecular variable (20 y 50 kDa), lo cual no permite calcular su concentración en términos de molaridad. La actividad de tirosina fosfatasa se expresó como pmoles de Pi liberado por minuto por  $\mu\text{l}$  de muestra. Corresponde señalar que la cantidad de proteínas en los eluidos no resultaba suficiente para realizar una determinación de proteínas sin pérdida significativa de muestra, por lo tanto la actividad se expresó en términos de volumen y no de concentración de proteínas.

#### -Ensayo de actividad de tirosina fosfatasa en gel

Este método permite detectar la actividad de tirosina fosfatasa en geles de poliacrilamida-SDS luego del fraccionamiento electroforético de las muestras (Burrige y Nelson, 1995). Para ello se prepararon geles de poliacrilamida-SDS como se describirá más adelante y previo a la polimerización se incorporaron a la mezcla  $5 \times 10^5$  cpm de pG [ $^{32}\text{P}$ ]T/ml. Cuando se produce la polimerización el pG [ $^{32}\text{P}$ ]T queda retenido en la matriz del gel. Una vez preparado el gel con el sustrato se siguió el protocolo que se describe a continuación para la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Luego de realizada la electroforesis, se procesó el gel con el objeto de remover el SDS y renaturalizar las proteínas para lograr un plegado correcto que les permita recuperar la actividad de tirosina fosfatasa. Este proceso consiste en sucesivos lavados del gel a temperatura ambiente con agitación, con distintas soluciones según se indican a continuación: a) Tris-HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo isopropanol 20 % (remoción del SDS), 5-16 horas; b) Tris-HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 0,3 %, 30 minutos, 2 veces; c) Tris-HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo EDTA 1 mM y clorhidrato de guanidina 6 M (solución de desnaturalización), 90 minutos; d) Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, conteniendo EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,3%, Tween20 0,04%, Tritón X-100 1% (solución de renaturalización), 1 hora, 3 veces. Luego de estos lavados los geles se incubaron en la solución de renaturalización indicada en c) con el agregado de DTT 4 mM, durante 5-16 horas. Finalmente los geles se tiñeron con azul de Coomassie, y se secaron antes de la exposición en placa autorradiográfica. La actividad de tirosina

fosfatasa se detectó por la remoción del  $^{32}\text{Pi}$  del sustrato contenido en el gel, evidenciándose en la autorradiografía como bandas claras (donde el Pi del sustrato ha sido removido por proteínas con acción de tirosina fosfatasas) sobre un fondo oscuro (debido al sustrato radiactivo incorporado en la matriz del gel).

## **X. Análisis de proteínas**

### **-Electroforesis de proteínas**

El análisis de las muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó conforme a la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Para esto se prepararon geles de poliacrilamida-SDS cuyas dimensiones fueron: 8 cm de altura x 6,5 cm de ancho x 0,75 mm de espesor. El gel separador se preparó rutinariamente con una mezcla de acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8% (utilizando concentraciones finales apropiadas según el tamaño de poro deseado), SDS 0,1% y Tris-HCl 375 mM pH 8,8. Para el gel concentrador se utilizó una solución de acrilamida 5%, bisacrilamida 0,136% en Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 conteniendo SDS 0,1%. Las muestras a sembrar en los geles fueron preparadas en una solución conteniendo Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,1% como indicador del frente de corrida. La electroforesis fue llevada a cabo a temperatura ambiente utilizando una solución de corrida conteniendo Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0,1%, aplicando un voltaje constante de aproximadamente 100 V, utilizando un equipo Mini-Protean III System de Bio-Rad. Finalizada la electroforesis, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF para efectuar el análisis por la técnica de Western blot (como se describe en el siguiente punto) o sujetos al tratamiento para desarrollar la actividad de tirosina fosfatasa como ya describimos.

---

-Western blot

El análisis de las proteínas por Western blot se realizó según la técnica descrita por Towbin y col. (Towbin y col., 1979). Luego de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad) en una solución amortiguadora conteniendo Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20% en un sistema semi-seco de BioRad a un amperaje constante de 2,4 mA/cm<sup>2</sup> durante 90 min. Finalizada la transferencia, para evaluar la eficiencia de la misma se tiñó el gel para detectar las proteínas no transferidas con azul de Coomassie 0,1% disuelto en una solución acuosa conteniendo etanol 25% y ácido acético 10%. La decoloración se realizó por sucesivos lavados con una solución conteniendo etanol 25% y ácido acético 10%. El secado de los geles se realizó por vacío y calor sobre papel de filtro con un equipo BioRad. La visualización de las proteínas transferidas a las membranas se realizó sumergiendo las mismas en una solución de Ponceau S (Ponceau S 0,2% en ácido acético 1%) durante 10 minutos removiendo luego el colorante no unido a proteínas por sucesivos lavados con metanol. A continuación, las membranas se incubaron en solución salina-Tris o TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) conteniendo Tween20 0,5% (TTBS) y BSA 1% (solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos. Luego de este procedimiento las membranas fueron incubadas durante 16 horas a 4 °C con la dilución apropiada del anticuerpo primario en TTBS-BSA 1%. Las diluciones de anticuerpo utilizadas para cada ensayo fueron las establecidas para nuestras muestras. Luego de este procedimiento, las membranas se lavaron cinco veces durante 10 minutos con TTBS, previo a la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo o de ratón generado en cabra, según corresponda) conjugado con peroxidasa, en la dilución apropiada para cada ensayo. Posteriormente las membranas fueron lavadas 4 veces con TTBS durante 10 minutos y una vez con TBS durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de revelar la señal específica. La detección de la señal se realizó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial ECL y autorradiografía.



Luego del revelado, se separó el anticuerpo de las membranas sometiéndolas a un tratamiento con una solución conteniendo SDS 0,2%, NaCl 0,5 M y urea 0,1 M, durante 2 horas a 70 °C. El objetivo de este procedimiento es remover los anticuerpos unidos a las membranas para permitir un nuevo análisis por Western blot utilizando un anticuerpo primario diferente.

#### -Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación de la proteína PTP1D se utilizó la fracción citosólica de la ZF de glándulas adrenales. Las muestras (200 µg de proteínas) se incubaron durante 16 horas a 4 °C en presencia de 4 µg del anticuerpo monoclonal anti-PTP1D y 40 µl de proteína A/G plus-agarosa en un volumen final de 0,5 ml de solución de inmunoprecipitación (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 1%, Nonidet P40 0,5%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 µM, NaF 50 mM, PMSF 1 mM y leupeptina 10 µM. Luego de esta incubación, las muestras se centrifugaron a 15000 x g durante 4 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y los precipitados se lavaron por centrifugación cuatro veces con 0,5 ml de la solución de inmunoprecipitación y finalmente se resuspendieron en solución de siembra conteniendo SDS. Las muestras así preparadas se desnaturalizaron por calor y se analizaron por Western blot y por geles de actividad de tirosina fosfatasas.

#### **XI. Fosforilación *in vitro* de proteínas de ZF de adrenal de rata**

Se realizó la fosforilación *in vitro* de las proteínas citosólicas de la ZF de la glándula adrenal (200 µg) utilizando la subunidad catalítica de la PKA como quinasa. Se utilizó 1 U de enzima y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (Actividad específica: 500 cpm/pmol) por cada ensayo efectuado con 50 µg de proteína. El medio de incubación incluyó además, solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 6,5 conteniendo acetato de magnesio 20 mM, ATP 200 µM, en un volumen total de 25 µl. Las incubaciones se realizaron a 30 °C durante 15 minutos. A partir de la mezcla de reacción de los ensayos. Se realizó la inmunoprecipitación de

PTP1D como se describió anteriormente. Los inmunoprecipitados se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía.

El mismo procedimiento de fosforilación pero sin el agregado de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (fosforilación en frío) se llevó a cabo para analizar la actividad de fosfatasa de la muestra fosforilada. Se realizó como se indicó anteriormente la inmunoprecipitación de PTP1D y los inmunoprecipitados se analizaron en geles de actividad de tirosina fosfatasa.

## **XII. Análisis de ARN mensajero**

### **-Extracción de ARN total**

Para la obtención de ARN total se utilizó el reactivo TRIZOL™ siguiendo la técnica recomendada por el fabricante GibcoBRL-Life Technologies; (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las células se lisaron por agregado de 1,2 ml de TRIZOL™ por pocillo de 6 cm de diámetro y ruptura mecánica con pipeta automática. Luego de este procedimiento, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para producir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Luego se agregó a las muestras cloroformo (0,24 ml/ml TRIZOL™). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y luego de una incubación de 3 minutos a temperatura ambiente se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se aisló la fase acuosa a la que se le agregó alcohol isopropílico (0,5 ml/ml TRIZOL™) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12000 x g a 4 °C para precipitar el ARN. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el ARN precipitado se lavó con etanol 75% (1 ml/ml TRIZOL™). Luego de centrifugar a 7.500 x g durante 5 minutos a 4 °C se retiró el sobrenadante y el ARN precipitado se secó al aire durante 10 min. Luego se agregaron 15  $\mu$ l de agua libre de RNasas y se incubó durante 10 minutos a 55-60 °C para lograr una completa disolución.

-Ensayos de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

Para realizar la transcripción reversa se tomó una alícuota correspondiente a 2-3  $\mu\text{g}$  de ARN total. El ARN se incubó a 70 °C durante 5 minutos con 1  $\mu\text{g}$  de oligonucleótidos al azar y  $\text{H}_2\text{O}$  hasta llevar a 15  $\mu\text{l}$ . A continuación, esta mezcla se colocó en un baño de agua-hielo durante 15 minutos. Luego se le adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de una solución amortiguadora apropiada para la enzima; 1,25  $\mu\text{l}$  dNTPs (0,5 mM); 0,625  $\mu\text{l}$  RNAsin (1 U/ $\mu\text{l}$ ); 2,125  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  y 200 U de la transcriptasa reversa M-MLV y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. Luego de finalizada la reacción se tomaron alícuotas de 2-3  $\mu\text{l}$  del ADNc obtenido y se efectuaron reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para las secuencias de MKP-1, PTP-PEST y PTP1D. Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados en base a las secuencias publicadas del ADNc de MKP-1, PTP-PEST y PTP1D. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 3.

Secuencia	Oligonucleótidos	Tamaño (kb)
MKP-1 (GeneBank™, accession number NM_013642)	5´-GAGCTGTGCAGCAAACAGTCC-3´ directo	0,74
	5´-CCGGTGGCAAGTGAAACTCC-3´ reverso	
PTP-PEST (GeneBank™ accession number NM_011203)	5´-ATGGAGCAAGTGGAGATCC-3´ directo	2,3
	5´-CCCTGCATCATGTCCATTC-3´ reverso	
PTP1D (GeneBank™ accession number NM_011202).	5´-AGACGGGAGGAACATGACATCG-3´ directo	1,8
	5´-CTTCTGAACGCACGCACG-3´ reverso	

**Tabla 3: Secuencias de los oligonucleótidos específicos utilizados para la reacción de PCR.** Se indica también el tamaño esperado para los productos de PCR de cada una de las secuencias estudiadas

La reacción de PCR se llevó a cabo en una solución amortiguadora conteniendo Tris 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino, 0,4 mM de cada uno de los dNTPs, 50 pmoles de cada oligonucleótido, 2,5 U de Taq ADN polimerasa y 2-3 µl de ADNc como templado. Las condiciones de amplificación del ADN estuvieron dadas por el siguiente protocolo: se realizaron 35 ciclos de amplificación donde la desnaturalización, hibridación de los oligonucleótidos y elongación del templado se llevó a cabo a 92 °C, 50-65 °C (dependiendo de las secuencias de los oligonucleótidos) y 72 °C respectivamente. Los productos de la reacción de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio. La identidad de todos los productos de PCR fue confirmada mediante mapeo con enzimas de restricción y secuenciación. El fragmento correspondiente a MKP-1 se aisló del gel de agarosa y se subclonó en el sitio EcoRI del vector pGEM-T easy Promega (Madison, WI, USA). Con esta construcción se transformaron bacterias competentes de la cepa XL1 .

-Marcado de la sonda por el método de oligonucleótidos al azar

El marcado de la sonda se realizó por el método de oligonucleótidos al azar utilizando los reactivos provisto por el kit Prime-a-Gene Promega (Madison, WI, USA) y siguiendo las especificaciones del fabricante. En un tubo Eppendorf se colocaron 25 ng del ADN templado, que se denaturalizaron por calor (100 °C, 2 minutos) e inmediatamente en baño de hielo. Luego se agregaron los siguientes reactivos: 10 µl de solución amortiguadora 5X, 2 µl de la mezcla de dNTPs no marcados (20 µM final de cada uno excepto dCTP), 2 µl de albúmina sérica bovina libre de nucleasas, (400 µg/ml final), 50 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP, 5 UI del fragmento Klenow de la ADN polimerasa, y agua libre de nucleasas en un volumen final de 50 µl. Luego de mezclar se dejó transcurrir la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas.

---

*-Northern blot*

Muestras de ARN total (20-25  $\mu\text{g}$ ) obtenido a partir de células bajo distintos tratamientos se prepararon para su análisis por Northern blot. Para ello, se agregaron al volumen correspondiente de muestra 12,3  $\mu\text{l}$  de formamida, 4,3  $\mu\text{l}$  de formaldehído (concentraciones finales 2,2 M y 50% respectivamente), 5  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora MOPS 5X, pH 7,4 (concentración final MOPS 40 mM, EDTA 100 mM, NaAc 400 mM, xilencianol 0,25% y glicerol 50%). Esta mezcla se calentó durante 15 minutos a 65 °C, luego se agregaron 5  $\mu\text{l}$  de solución de siembra (EDTA 1 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,25%) y se mantuvo en hielo hasta la siembra en los geles de agarosa.

La separación electroforética se realizó en geles de agarosa 1,2% disuelta en solución MOPS 1X-formaldehído 2,2 M. La electroforesis se realizó a voltaje constante (75 V) durante 4 horas. El ARN se transfirió por capilaridad a membranas de nylon Hybond<sup>TM</sup>-N en buffer 20X SSPE (NaCl 3M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M, 0,02 M EDTA, pH 7,4) durante toda la noche. Las membranas se colocaron en la estufa a 80 °C durante 2 horas para fijar el ARN. Luego de este procedimiento se verificó la transferencia por tinción del ARN con una solución de azul de metileno (azul de metileno 0,03% en NaAc 0,3 M pH 5,2). A continuación se removió el colorante mediante lavados sucesivos con agua destilada. El bloqueo de sitios de unión inespecíficos se efectuó en solución de prehibridación (5x SSPE, 5x solución Denhardt's, formamida 50%, SDS 1% y ADN de esperma de salmón 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Finalmente, las membranas se incubaron con la sonda específica (en nuestro caso la sonda correspondiente al ARNm de MKP-1) en solución de prehibridación durante 16 horas. Luego las membranas se lavaron dos veces con SSPE 2X, SDS 0,5% a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego dos veces con SSPE 1X; SDS 0,1% a 65 °C durante 30 minutos. Al término de estos procedimientos se realizó la exposición de la membrana a una pantalla Storage Phosphor Screen de Kodak y posterior revelado con el Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics Scanner, Amersham Pharmacia Biotech). En otros casos las membranas se expusieron a autorradiografía. Todas las imágenes de las señales obtenidas se analizaron y cuantificaron utilizando el programa Image Quant. Tras

cuantificar las señales, las membranas se lavaron tres veces con SDS 0,1% a 95 °C con el fin de remover la sonda remanente, y se repitió el proceso desde el comienzo utilizando sondas para GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) o el ARN ribosomal 18s. Los niveles relativos de ARNm fueron calculados normalizando la señal de la primera hibridación con la señal de GAPDH o ARNr 18s.

### **XIII. Otros procedimientos**

#### *-Cuantificación de proteínas*

La concentración de proteínas en las muestras fue determinada siguiendo el método descrito por Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina sérica bovina como proteína patrón.

#### *-Análisis estadístico*

Los resultados se muestran como la media  $\pm$  DE. La significación estadística fue evaluada utilizando ANOVA, seguida por análisis de Tukey. Se consideró significativa  $P < 0,05$ .

***RESULTADOS***

---

## **I. IDENTIFICACIÓN DE LAS PTPs DE ZF REGULADAS POR ACTH**

### **I.1. Caracterización de la tirosina fosfatasa de 115 kDa de ZF de adrenal de rata**

En la fracción citosólica de ZF de adrenal de rata se detectan, mediante análisis en geles de actividad de tirosina fosfatasa, tres enzimas que exhiben mayor actividad cuando provienen de animales tratados con ACTH por 15 minutos, una de éstas es una tirosina fosfatasa de 115 kDa de peso molecular (PTP115). PTP115 puede ser activada por fosforilación *in vitro* con PKA, según el análisis de la muestra mediante el ensayo de actividad de tirosina fosfatasa en gel (Paz y col., 2000). Más aún, se observó que cuando se aísla la fracción citosólica de adrenales de rata tratadas con ACTH y se la incuba con fosfatasa ácida de papa, la actividad correspondiente a esta enzima se reduce (Paz y col., 2000). El análisis bibliográfico no revela PTPs con características compatibles con la enzima de 115 kDa de ZF de adrenal. Por lo tanto, se propuso analizar aspectos regulatorios de la actividad enzimática e identificar la proteína. Con esta finalidad se puso a punto un protocolo para la purificación parcial en escala analítica de dicha proteína.

#### **I.1.1. Purificación parcial de PTP115**

##### **I.1.1.a. Análisis de la actividad enzimática de las muestras en las diferentes etapas del proceso de purificación**

Para analizar las fracciones obtenidas en cada paso de purificación se empleó el ensayo de actividad en geles que se describe en Materiales y Métodos. Las distintas fracciones provenientes de un paso de purificación se analizaron en paralelo con alícuotas del extracto obtenido al reunir las fracciones seleccionadas del paso anterior. Esta metodología permitió seleccionar las fracciones que presentaban mayor actividad en la banda correspondiente a 115 kDa. Es importante señalar que para valorar la actividad de una PTP particular en las diferentes muestras de un fraccionamiento proteico no resulta de utilidad el ensayo de actividad en solución porque con



este método la actividad evaluada será el resultado de la actividad de todas las PTPs presentes en la muestra. Por lo tanto, para el protocolo de purificación que se describe se optó, por analizar las fracciones en geles de actividad y estimar la actividad de PTP115 por densitometría de la banda correspondiente.

En los ensayos de tirosina fosfatasa en geles, una cantidad de proteínas no detectable aún mediante tinción con nitrato de plata suele dar una señal de actividad muy notoria. Esta característica, sumada a la posibilidad de distinguir la actividad de cada enzima presente en una muestra conteniendo varias PTPs, evidencia la utilidad de los ensayos de actividad de tirosina fosfatasa en geles de poliacrilamida-SDS para resolver la purificación de una PTP.

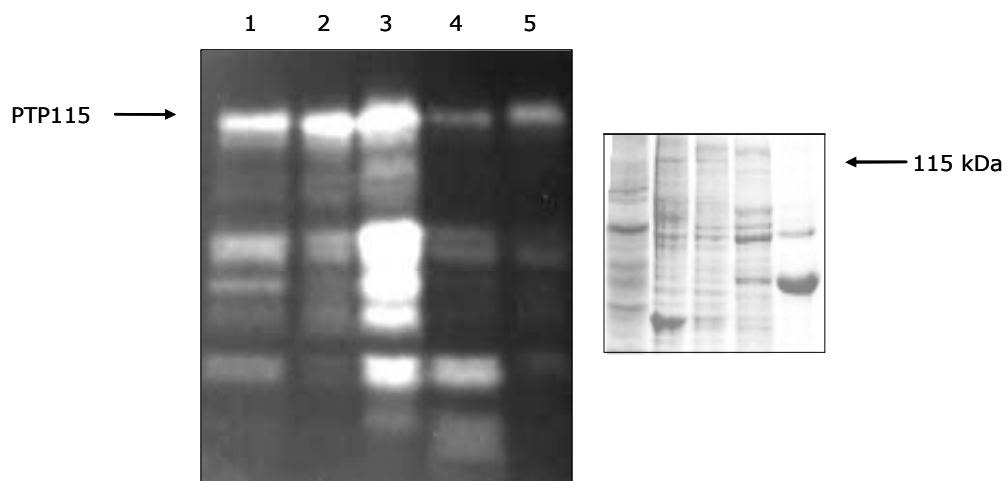
#### **I.1.1.b. Obtención de la fracción citosólica de ZF de adrenal de rata**

Las glándulas adrenales se obtuvieron a partir de ratas tratadas con dexametasona durante la noche previa al sacrificio. En un procedimiento tipo, la purificación se realizó a partir de las glándulas adrenales de 30 ratas. Inmediatamente después del sacrificio, las glándulas fueron removidas del animal, decapsuladas y desmeduladas para obtener la ZF. Luego se cortaron en cuartos para su posterior homogeneización en un volumen de 0,2 ml de solución amortiguadora por adrenal. Este homogenato fue sometido a centrifugación diferencial para aislar las proteínas citosólicas que fueron utilizadas en los pasos de purificación.

#### **I.1.1.c. Fraccionamiento mediante precipitación con sulfato de amonio**

El primer paso de purificación consistió en precipitar las proteínas citosólicas con soluciones con distinto grado de saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 30, 50, 70 y 90%. Luego de efectuar la precipitación, las proteínas se disolvieron en una solución amortiguadora apropiada. Para eliminar las sales se dializaron las distintas fracciones durante 18 horas. Luego de la diálisis se tomaron alícuotas apropiadas (5-10  $\mu\text{g}$ ) de las proteínas precipitadas de cada fracción y se analizaron en geles de actividad. Un perfil de actividad típico de este paso se muestra en la Figura 7. Se observó que PTP115 precipita mayoritariamente con soluciones saturadas al 30 y al 50% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Para continuar con el

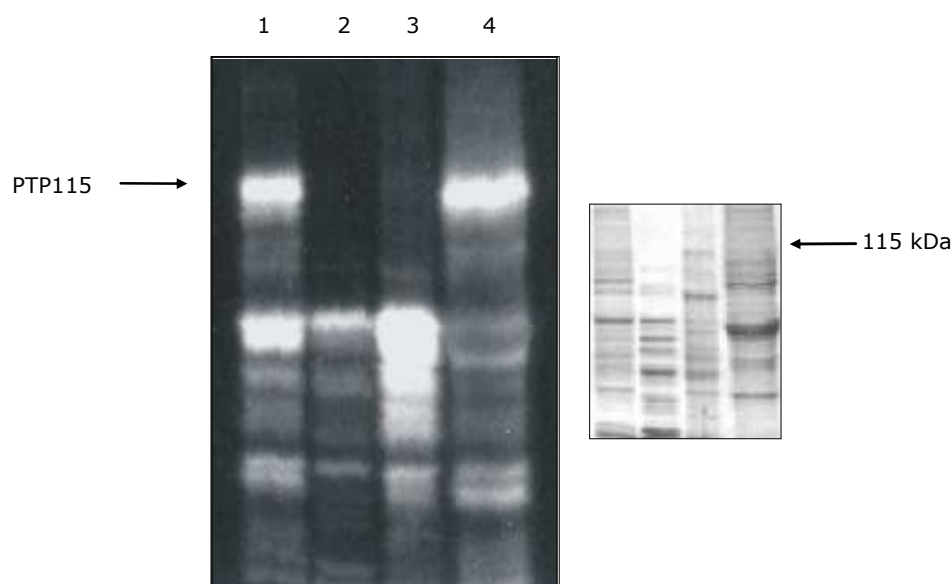
protocolo de purificación, se eligió la fracción precipitada con solución saturada al 30%. Cabe destacar que aunque en la fracción correspondiente a la precipitación con una solución saturada al 50% la actividad que corresponde a PTP115 parece ser mayor que la que se observa en la fracción elegida esta muestra, según lo que se observa en la Figura 7, dicha fracción contiene cantidades apreciables de otras PTPs de menor peso molecular. Teniendo presente que uno de los objetivos era realizar ensayos de actividad de PTP en solución con el fin de caracterizar la actividad enzimática de la muestra parcialmente purificada, se prefirió no utilizar esta fracción en los pasos subsiguientes. Aún cuando el precipitado proveniente de la solución saturada al 90 % aparenta ser el más puro respecto a la actividad de tirosina fosfatasa, su cantidad en masa resultaría extremadamente pequeña como para permitir pasos ulteriores de purificación.



**Figura 7. Fraccionamiento de las proteínas citosólicas de ZF de adrenal de rata con soluciones de saturación creciente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .** Se ensayó la precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de proteínas citosólicas de ZF de adrenal de rata. Cada fracción precipitada se dializó durante 18 horas. Luego se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{g}$  de proteínas citosólicas y 5  $\mu\text{g}$  de proteínas correspondientes a cada paso de precipitación y se analizaron a través de geles de actividad de fosfatasa. Luego de teñido y secado, el gel fue expuesto a una película radiográfica. Se muestra la autorradiografía (Panel principal) y la tinción del gel con azul de Coomassie de un experimento representativo realizado independientemente cuatro veces (Panel secundario). Calle 1: proteínas citosólicas, calles 2, 3, 4, 5: fracciones correspondientes a las proteínas precipitadas a partir de soluciones de 30, 50 70 y 90% de saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  respectivamente.

#### I.1.1.d. Fraccionamiento mediante columna de intercambio aniónico

La solución conteniendo la muestra dializada del paso anterior se sembró en una columna de intercambio aniónico de DEAE-celulosa equilibrada con una solución amortiguadora cuya composición se indica en Materiales y Métodos. Luego de recoger la siembra, la columna se lavó tres veces con la solución amortiguadora y se realizó la elución con un gradiente discontinuo de NaCl. Se hicieron cuatro eluciones sucesivas con soluciones de concentración creciente de NaCl (entre 100 y 400 mM). Luego de cuantificar la proteína presente en cada fracción, se tomaron alícuotas apropiadas que se utilizaron para determinar la actividad por ensayos de actividad en gel (Figura 8).

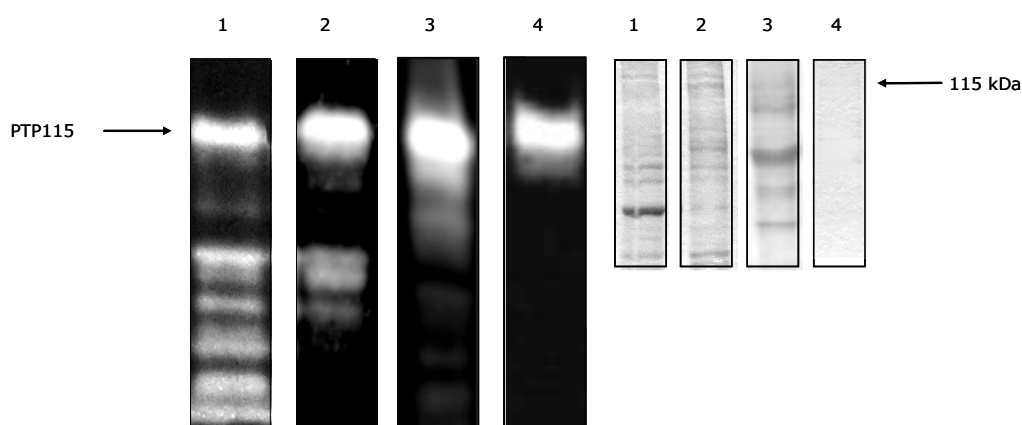


**Figura 8. Cromatografía de intercambio aniónico de la fracción correspondiente al precipitado con la solución saturada al 30% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .** La fracción que corresponde a las proteínas precipitadas con solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturada al 30 % se sembró en una columna de intercambio aniónico. Las proteínas se eluyeron con soluciones de NaCl de concentración entre 100 y 400 mM. Cada fracción eluida se analizó a través de geles de actividad de fosfatasas. Luego de teñido y secado, el gel fue expuesto a una película radiográfica. En la figura se muestra la autorradiografía (Panel principal) y la tinción del gel con azul de Coomassie (Panel secundario) de un experimento representativo realizado independientemente tres veces. Calle 1: proteínas precipitadas con solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturada al 30% (material sembrado en la columna) (10  $\mu\text{g}$ ), calle 2: muestra eluida durante la siembra (2  $\mu\text{g}$ ), calle 3: muestra eluida con solución 100 mM NaCl (2  $\mu\text{g}$ ), calle 4: muestra eluida con solución 400 mM NaCl (2  $\mu\text{g}$ ).

Los geles de actividad de tirosina fosfatasa permitieron determinar que la muestra que eluía con 400 mM de NaCl de la columna de DEAE-celulosa conservaba gran parte de PTP115 y contenía relativamente poca cantidad de otras tirosina fosfatasas.

#### **I.1.1.e. Fraccionamiento por filtración**

Para continuar la purificación, la solución conteniendo las proteínas eluidas con la solución de NaCl 400 mM fue filtrada a través de filtros Amicon con un tamaño de poro de 100 kDa, como se indica en Materiales y Métodos. Esta etapa permitió eliminar el NaCl utilizado en la elución de la columna de DEAE, concentrar la muestra y excluir proteínas de menos de 100 kDa de peso molecular. Luego del filtrado, se tomó una alícuota de la solución conteniendo las proteínas retenidas en el filtro, para su análisis por electroforesis en geles para la detección de actividad de tirosina fosfatasa. En la Figura 9 se observa la banda de actividad correspondiente a PTP115 a través de los sucesivos pasos de purificación.



**Figura 9. Análisis de PTP115 a través de los sucesivos pasos de purificación.** La figura muestra la autorradiografía correspondiente al análisis electroforético en geles de actividad de tirosina fosfatasa de las muestras seleccionadas en cada paso de un experimento de purificación tipo, realizado al menos tres veces. Calle 1: proteínas citosólicas, calle 2: proteínas precipitadas con solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturada al 30%, calle 3: proteínas eluidas de la columna de DEAE-celulosa con NaCl 400 mM, calle 4: proteínas retenidas en el filtro Amicon (punto de corte 100 kDa).

El análisis de la solución retenida en el filtro reveló una tirosina fosfatasa de 115 kDa (Figura 9, calle 4), mientras que no se detectaron proteínas en esa muestra mediante la tinción con azul de Coomassie.

En un procedimiento de purificación como el descrito, partiendo de 38 mg de proteínas citosólicas (material obtenido a partir de 60 adrenales), se aisló un volumen de filtrado de aproximadamente 200  $\mu$ l conteniendo una cantidad de proteínas inferior a 0,5  $\mu$ g. Se estimó que el grado de purificación alcanzado con el procedimiento descrito es superior a 6000 veces. A juzgar por los datos de la Tabla 4, se infiere que la filtración incrementa notoriamente el grado de purificación.

<b>Fracción proteica</b>	<b>Proteínas (<math>\mu</math>g)</b>	<b>Actividad específica (UA/<math>\mu</math>g)</b>
Citosol	38.000	1
Precipitado con solución saturada al 30 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	749	12
Eluido de la columna de intercambio aniónico correspondiente a 400 mM de NaCl	80	39
Solución retenida en el filtro Amicon	< 0,5	6100

**Tabla 4: Cantidad de proteína y actividad específica de la muestra recuperada tras los sucesivos pasos de purificación.** En la tabla se muestran los datos correspondientes a un experimento tipo. UA: unidades arbitrarias.

### **I.1.2. Estudio de los parámetros cinéticos de la enzima**

El procedimiento de purificación descrito permitió aislar una muestra de PTP115 que –aunque no totalmente pura- no contiene cantidades detectables de otras tirosina fosfatasas. La obtención de una muestra con esta característica era un requisito para poder utilizarla en ensayos donde se cuantifica la actividad de tirosina fosfatasa en solución, un procedimiento necesario para efectuar la determinación de los parámetros cinéticos de la

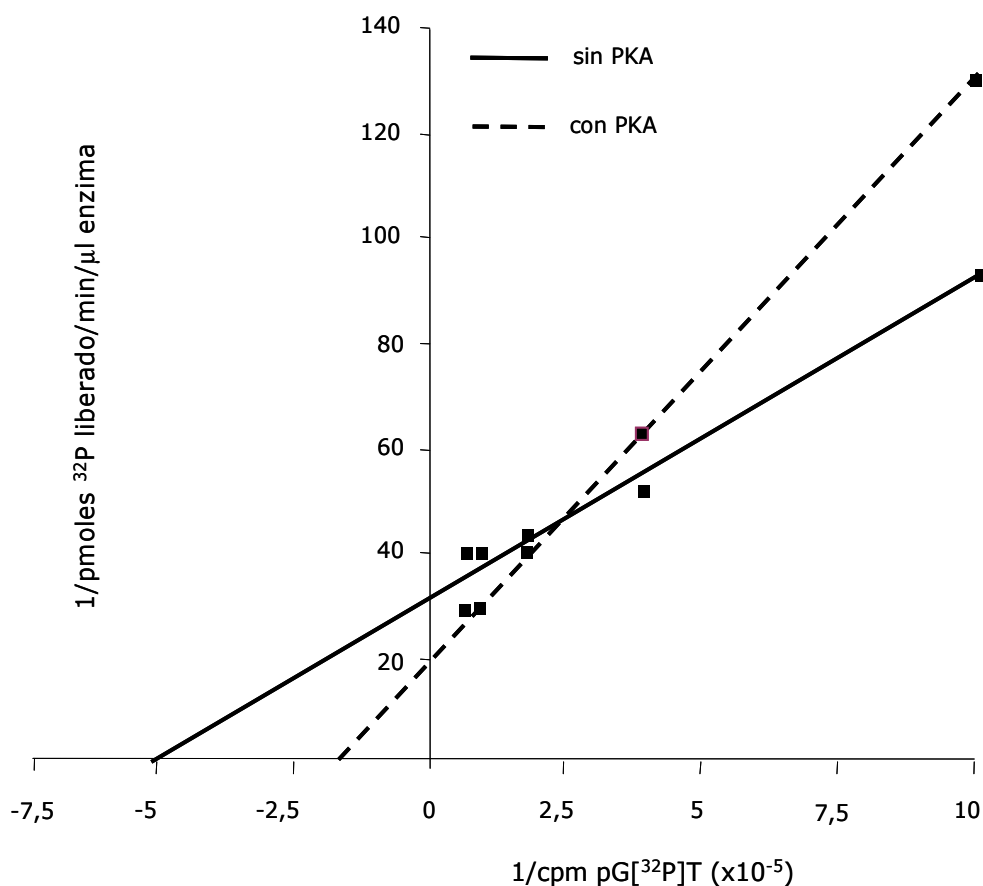
enzima. Con la muestra parcialmente purificada se procedió a realizar un ensayo de fosforilación *in vitro* con PKA (y sin PKA, como control). A continuación, se procedió a determinar los parámetros cinéticos de la enzima y si los mismos se modifican según el grado de fosforilación de la proteína. Luego de realizado el ensayo de fosforilación, se utilizaron alícuotas apropiadas de la mezcla de reacción como fuente de enzima para desfosforilar al sustrato sintético pGT marcado radiactivamente, pG[<sup>32</sup>P]T, mediante el ensayo de actividad de fosfatasa en solución que se describe en Materiales y Métodos. Se evaluó la velocidad de la reacción de desfosforilación en función de la cantidad de sustrato. Como se explica en Materiales y Métodos, el pGT no tiene un peso molecular definido y por ende no puede calcularse un valor de concentración del mismo en términos de molaridad. Por lo tanto, para analizar los datos del experimento que se describe, la concentración de sustrato (pG[<sup>32</sup>P]T) se expresó en términos de la radiactividad ofertada en cada reacción de fosfatasa, expresada en cpm, parámetro proporcional a la concentración.

Los datos obtenidos se volcaron en un gráfico donde se representaron las inversas de los datos de velocidad en función de las inversas de los valores de radiactividad (Figura 10).

De este estudio se concluye que la fosforilación incrementa la velocidad máxima de la PTP115 y aumenta su Km aparente, lo que surge al comparar los datos obtenidos con la enzima sometida al ensayo de fosforilación en presencia y ausencia de PKA. Los valores de Km y de Vmax. (velocidad máxima) calculados a partir del gráfico se muestran la Tabla 5

<b>Tratamiento</b>	<b>Km</b> (cpm pG[ <sup>32</sup> P]T)	<b>Vmax</b> (pmoles <sup>32</sup> P liberado/min/μl enzima)
Sin PKA	19230	0,033
Con PKA	58823	0,053

**Tabla 5.** Los parámetros cinéticos (Km y Vmax.) de PTP115 se estimaron a partir del gráfico de las inversas que se muestra a continuación.



**Figura 10. Efecto de la fosforilación *in vitro* con PKA sobre los parámetros cinéticos de PTP115.** Se realizó la fosforilación *in vitro* en presencia o ausencia de PKA de una alícuota de la proteína retenida en el filtro en el último paso de purificación. Luego se tomaron alícuotas apropiadas de las mezclas de reacción y se efectuaron ensayos de actividad de fosfatasa en solución utilizando distintas cantidades del sustrato pG[<sup>32</sup>P]T. Al término de la reacción de desfosforilación se precipitó el pG[<sup>32</sup>P]T y se aisló el sobrenadante para valorar el Pi liberado a través de la cuantificación de la radiactividad. La figura corresponde a un experimento representativo.

### **I. 1. 3. Identificación de la proteína semipurificada**

Una tirosina fosfatasa que presenta algunas características compatibles con la tirosina fosfatasa de 115 kDa de ZF de adrenal de rata (PTP115) puede ser PTP-PEST. Esta enzima es fosforilada por PKA (Garton y Tonks, 1994) y, aunque tiene un peso molecular de 80 kDa, exhibe una movilidad

electroforética correspondiente a una proteína de 125 kDa según la bibliografía (Horsch y col., 2001). Aunque la función de PTP-PEST en la reorganización del citoesqueleto ha sido analizada en un número importante de trabajos (Shenolikar, 1994; Angers-Loustau y col., 1999; Jamieson y col., 2005), hasta muy recientemente no se disponía de un anticuerpo de origen comercial dirigido contra esta enzima. Durante el transcurso de este trabajo surgió en el mercado un anticuerpo dirigido contra PTP-PEST, que aunque no se recomienda para ensayos de inmunoprecipitación puede ser utilizado en ensayos de Western blot. Al disponer de ese anticuerpo anti PTP-PEST se procedió a analizar por Western blot las muestras provenientes de ZF de adrenal de rata con distinto grado de purificación (Figura 11). Mediante este análisis se determinó que el anticuerpo anti PTP-PEST reconoce una banda específica, que migra con una movilidad electroforética correspondiente a una proteína de 115 kDa en la fracción citosólica (calle 1), en la muestra obtenida al precipitar las proteínas citosólicas con solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 30% (calle 2) y en la fracción que eluye de la columna de DEAE-celulosa con una solución de NaCl 400 mM (calle 3). Cabe mencionar que no se logró detectar por Western blot ninguna señal con el anticuerpo dirigido contra PTP-PEST en la solución proteica retenida en el filtro de 100 kDa, aunque se analizaron diferentes volúmenes de esta preparación.



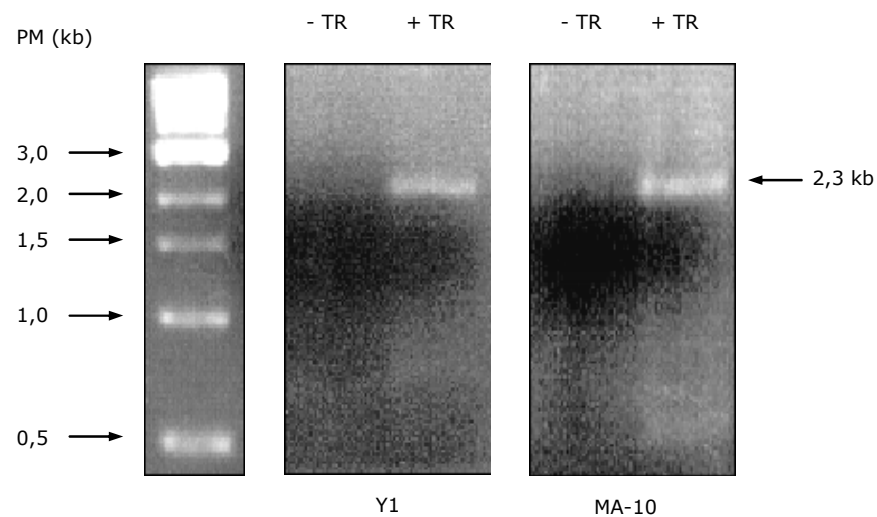
**Figura 11. Identificación de la PTP de 115 kDa como PTP-PEST.** Muestras de proteínas citosólicas de ZF de adrenal con diferente grado de purificación (30  $\mu\text{g}$ ) se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo contra la proteína PTP-PEST. La banda específica fue revelada por quimioluminiscencia. Calle 1: proteínas citosólicas, calle 2: proteínas precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30%, calle 3: proteínas eluidas de la columna de DEAE-celulosa con 400 mM NaCl.



#### **I.1.4. Detección del ARNm correspondiente a PTP-PEST en células esteroideogénicas**

El análisis en geles de actividad de tirosina fosfatasa de los lisados de células adrenocorticales de la línea Y1, revela un perfil enzimático muy similar al de ZF de adrenal de rata (datos no mostrados). Incluso se detecta una tirosina fosfatasa que migra con una movilidad electroforética correspondiente a una proteína de 115-120 kDa de peso molecular, al igual que en células de Leydig de la línea MA-10 (Cornejo Maciel y col., 2001). Estos antecedentes sugerían que la tirosina fosfatasa de 115 kDa de estos tipos celulares podía ser PTP-PEST. Con el fin de analizar esta hipótesis, se estudió por RT-PCR la presencia del ARNm correspondiente a PTP-PEST. A partir de las células Y1 se obtuvo el ARN total, y una alícuota de este ARN se sometió a una reacción de transcripción reversa y posterior PCR, utilizando oligonucleótidos específicos. Luego se procedió a efectuar la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa con bromuro de etidio. En la Figura 12 se puede observar una banda específica del tamaño esperado para el ADNc de PTP-PEST, en las calles correspondientes a la línea Y1. El mismo análisis se llevó a cabo en otra línea celular esteroideogénica, las células de Leydig MA-10, donde también se puede observar en las calles correspondientes, el fragmento de ADNc de tamaño compatible con el esperado para PTP-PEST. Estos resultados se confirmaron al determinar la secuencia de los productos de PCR. Si bien se detectó la presencia del ARNm de PTP-PEST en células Y1 y MA-10, el análisis de los lisados celulares totales mediante Western blot con el anticuerpo específico reveló varias bandas correspondientes a proteínas de peso molecular próximo a 115-120 kDa, lo que impidió identificar a PTP-PEST en estas muestras.

En síntesis, los resultados presentados en esta sección permiten inferir que PTP-PEST es la tirosina fosfatasa de 115 kDa que se activa por ACTH en ZF de adrenal de rata.



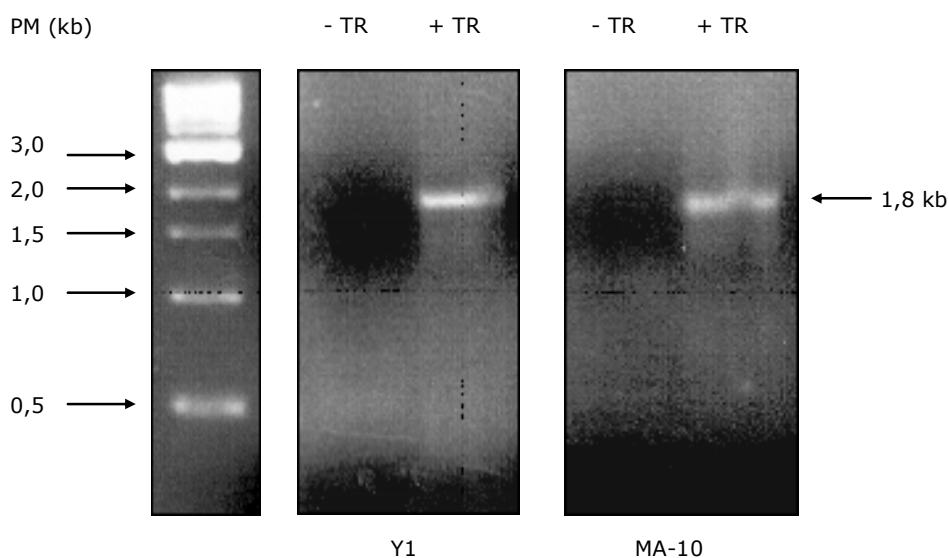
**Figura 12. Detección del ADNc de PTP-PEST en células adrenocorticales de la línea Y1 y en células de Leydig de la línea MA-10.** Se obtuvo el ARN total de células Y1 y MA-10, y se sometió a reacciones de RT-PCR. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron por irradiación con luz UV. En la figura se muestra una fotografía del gel. -TR, sin transcriptasa reversa; +TR, con transcriptasa reversa.

## **I.2. Caracterización de la tirosina fosfatasa de 80 kDa de ZF de adrenal de rata**

En células adrenocorticales bovinas, ACTH activa la tirosina fosfatasa PTP1D (72 kDa) por fosforilación dependiente de PKA (Rocchi y col., 2000). En ZF de adrenal de rata una de las tirosina fosfatasas que se activa en respuesta a ACTH/AMPC migra en geles de actividad, con una movilidad electroforética correspondiente a una proteína de aproximadamente 80 kDa (Paz y col., 1999). Más aún, en los lisados de células adrenocorticales de la línea Y1 se detecta, mediante análisis en geles de actividad de tirosina fosfatasa, una banda de actividad correspondiente a proteína de 80 kDa. La tirosina fosfatasa de 80 kDa que se activa vía ACTH en ZF de adrenal y PTP1D presentan características comunes, como por ejemplo el hecho de ser activadas vía PKA y exhibir similar movilidad electroforética. En base a estas similitudes el objetivo de esta parte del trabajo fue analizar si la tirosina fosfatasa de 80 kDa que se

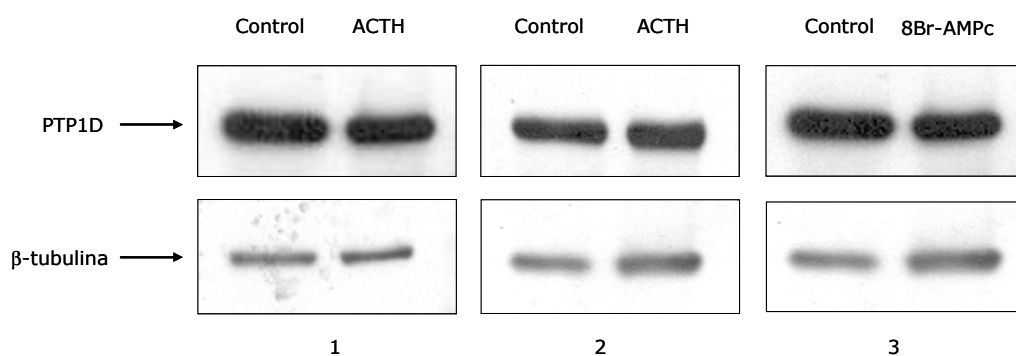
activa en los sistemas esteroideogénicos mencionados en respuesta a la acción hormonal es PTP1D.

En primer lugar se estudió la expresión de PTP1D tanto en células adrenocorticales de la línea Y1 como en células de Leydig de la línea MA-10. Para esto se obtuvo el ARN total a partir de cultivos de estas células, y una alícuota de este ARN se sometió a una reacción de transcripción reversa y posterior PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Luego se procedió a efectuar la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa con bromuro de etidio (Figura 13). Se detectó una banda específica del tamaño esperado para el ADNc de PTP1D en las muestras procedentes de células adrenocorticales Y1 y de células de Leydig MA-10.



**Figura 13. Detección del ADNc de PTP1D en células adrenocorticales de la línea Y1 y en células de Leydig de la línea MA-10.** Se obtuvo el ARN total de células Y1 y MA-10, y se sometió a experimentos de RT-PCR. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron por irradiación con luz UV. En la figura se muestra una fotografía del gel. -TR, sin transcriptasa reversa; +TR, con transcriptasa reversa.

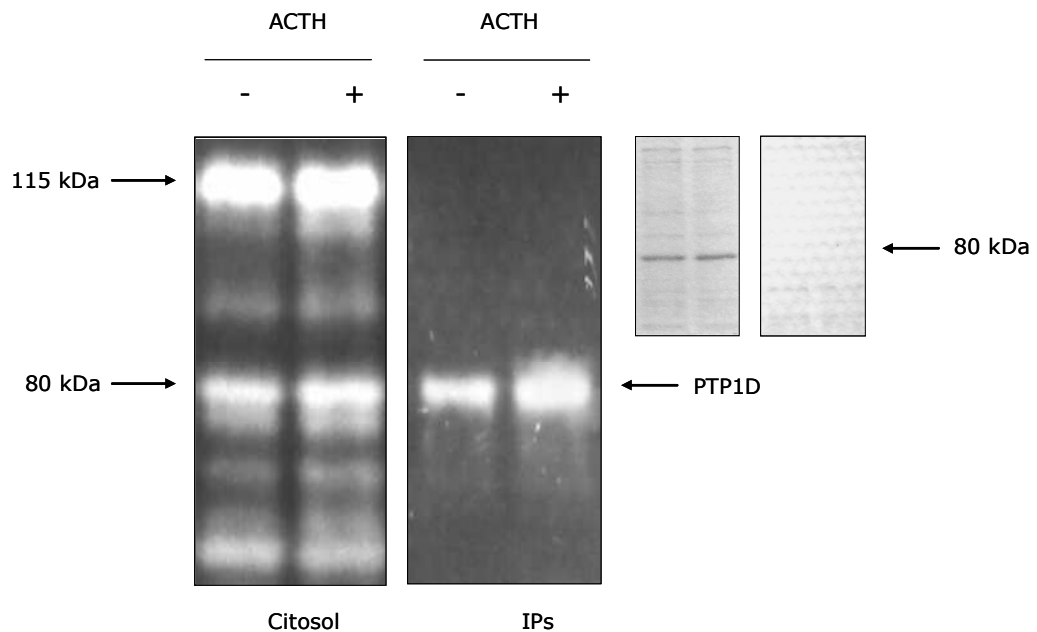
A continuación, se examinó la expresión de la proteína en células MA-10, Y1 y en ZF de adrenal de rata. Las células Y1 y MA-10 se incubaron en presencia de ACTH y 8Br-AMPC respectivamente, durante 15 minutos. Las proteínas citosólicas de ZF se aislaron a partir de adrenales de ratas tratadas con dexametasona e inyectadas con solución salina (control) o con 200 µg de ACTH/kg peso durante 15 minutos (Podesta y col., 1979). Luego de la estimulación se lisaron las células, y por otra parte se aislaron las proteínas de la fracción citosólica de ZF. Estos extractos se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo comercial que reconoce a la proteína PTP1D. Según se observa en la Figura 14, el anticuerpo reconoce una proteína que migra con una movilidad electroforética correspondiente a 80 kDa en los tres sistemas estudiados. Estos resultados demuestran que las células de Leydig y adrenocorticales (Y1 y ZF de adrenal) expresan la proteína PTP1D. Corresponde señalar que no se detectaron cambios en los niveles de expresión de PTP1D por efecto de la estimulación con ACTH u 8Br-AMPC.



**Figura 14. Detección de PTP1D en células Y1 y MA-10 y en ZF de adrenal de rata.** Las proteínas (40 µg) provenientes de lisados de células Y1 y MA-10 (controles y estimuladas durante 15 minutos) y de la fracción citosólica de ZF de adrenal de rata (controles y tratadas durante 15 minutos) se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo comercial dirigido contra la proteína PTP1D. Las bandas específicas fueron detectadas por quimioluminiscencia, como se indica en Materiales y Métodos. La figura corresponde a la autorradiografía de un experimento representativo. Panel 1: lisado de células Y1, panel 2: lisado de células MA-10, panel 3: proteínas citosólicas de ZF de adrenal de rata.

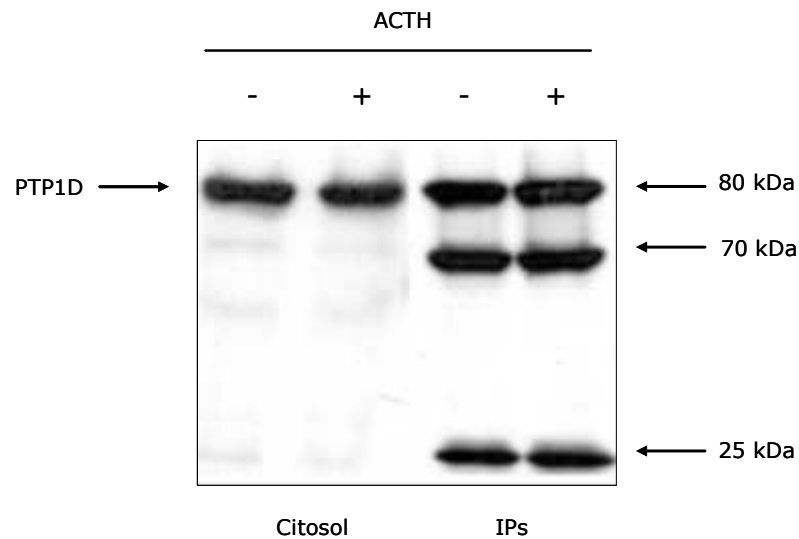
---

Dado que ACTH es capaz de promover la fosforilación y activación de PTP1D en células adrenocorticales bovinas, es posible que esta enzima sea blanco de la acción de ACTH también en ZF de adrenal de rata. Refuerza este concepto el hecho de que PTP1D, aún cuando esta descrita como una proteína de 72 kDa, en los sistemas en estudio se detecta como una proteína con movilidad electroforética correspondiente a una proteína de 80 kDa. Por lo tanto, a continuación, se procedió a analizar si la fosfatasa PTP1D es blanco de la acción de ACTH en ZF de adrenal de rata. Para esto, ratas tratadas con dexametasona se inyectaron con solución salina o con 200 µg de ACTH/kg peso y fueron sacrificadas a los 15 minutos (Podesta y col., 1979). Inmediatamente después del sacrificio, se removieron las adrenales y se procedió a obtener la fracción citosólica. A partir de las proteínas citosólicas se hicieron ensayos de inmunoprecipitación, utilizando el anticuerpo anti-PTP1D. Antes del último lavado cada inmunoprecipitado se separó en dos alícuotas: una para análisis en geles de actividad y otra para análisis por Western blot. Se analizaron alícuotas tanto de los inmunoprecipitados (IPs) (correspondientes a 80 µg de proteínas citosólicas) como de la solución de proteínas citosólicas a partir de la cual se realizó la inmunoprecipitación (Citosol) (10 µg), mediante ensayos de actividad de tirosina fosfatasa en gel. Como muestra la Figura 15, la proteína inmunoprecipitada (PTP1D, 80 kDa) a partir de las proteínas citosólicas de adrenales de ratas tratadas con ACTH, presenta una mayor actividad respecto de las proteínas inmunoprecipitadas a partir de proteínas citosólicas obtenidas de animales no tratados. Como control de carga se muestra la tinción con azul de Coomassie del mismo gel.



**Figura 15. Análisis en geles de actividad de tirosina fosfatasa de los inmunoprecipitados de PTP1D obtenidos a partir de ZF de adrenal de rata.** A partir de las proteínas citosólicas de ZF de adrenal de ratas tanto controles (-), como tratadas con ACTH (+), se realizó la inmunoprecipitación de PTP1D con un anticuerpo específico. Los inmunoprecipitados (IPs) (correspondientes a 80  $\mu$ g de proteínas) y alícuotas de las fracciones citosólicas de partida (10  $\mu$ g de proteínas), se analizaron en geles de actividad de fosfatasa. Se muestra la autorradiografía (Panel principal) y la tinción del gel con azul de Coomassie (Panel secundario), de un experimento representativo realizado independientemente tres veces.

Otra alícuota de los inmunoprecipitados con los que se realizó el ensayo anterior, se analizó por Western blot utilizando el anticuerpo dirigido contra PTP1D. En la Figura 16, se observa que el anticuerpo reconoce en los inmunoprecipitados y en las fracciones de proteínas citosólicas, una proteína de 80 kDa correspondiente a PTP1D. A juzgar por la intensidad de las señales, la cantidad de PTP1D inmunoprecipitada a partir de proteínas provenientes de animales tratados con ACTH y controles es similar. Esto indica que la diferencia de actividad observada en la banda de 80 kDa (Figura 15), entre los inmunoprecipitados obtenidos a partir de ratas tratadas con ACTH y controles, no es consecuencia de una diferencia en la cantidad de proteínas inmunoprecipitadas. Por lo tanto, la mayor actividad observada puede atribuirse a la activación de PTP1D por acción de ACTH.

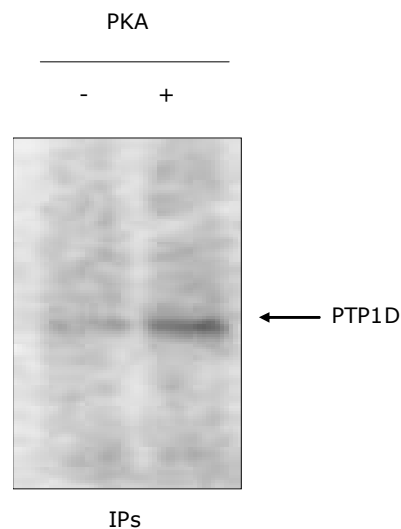


**Figura 16. Análisis por Western blot de los inmunoprecipitados de PTP1D obtenidos a partir de las proteínas citosólicas de ZF de adrenal de rata.**

Otra fracción de cada inmunoprecipitado, del cual se extrajo la muestra analizada en el experimento descrito en la figura anterior, se utilizó para el reconocimiento de PTP1D por Western blot. En la figura se muestran las señales detectadas por el anticuerpo específico, al analizar los inmunoprecipitados (IPs) (correspondientes a 100  $\mu$ g de proteínas citosólicas), y alícuotas de las proteínas citosólicas de partida (30  $\mu$ g) (citosol), correspondientes a muestras provenientes tanto de animales controles (-) como tratados con ACTH (+). Se muestra la autorradiografía de un experimento representativo realizado independientemente tres veces. En los carriles correspondientes a los inmunoprecipitados, además de la señal específica, se detectan las bandas correspondientes a las inmunoglobulinas.

El siguiente paso consistió en analizar si PTP1D es fosforilada *in vitro* por acción de PKA. Con este fin, se utilizaron las proteínas citosólicas de ZF de adrenales de ratas tratadas con dexametasona (controles), como se indica en Materiales y Métodos. Se tomaron alícuotas de la fracción citosólica y se sometieron a ensayos de fosforilación, en presencia o ausencia de la subunidad catalítica de PKA y  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , en las condiciones que se describen en Materiales y Métodos. Al término de la incubación, se aisló una alícuota del medio de reacción, se diluyó en forma apropiada y se realizó la inmunoprecipitación con el anticuerpo dirigido contra PTP1D. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por SDS-PAGE, tras lo cual el gel se tiñó con azul de Coomassie, antes de su exposición en placa autorradiográfica. El

análisis de los inmunoprecipitados (IPs), reveló una banda correspondiente a una proteína de 80 kDa (Figura 17). La intensidad de la señal correspondiente al inmunoprecipitado obtenido a partir de la muestra incubada con PKA, es mayor que la correspondiente al inmunoprecipitado obtenido de la muestra incubada en ausencia de esta quinasa, lo cual demuestra que PTP1D es fosforilada *in vitro* por acción de PKA.



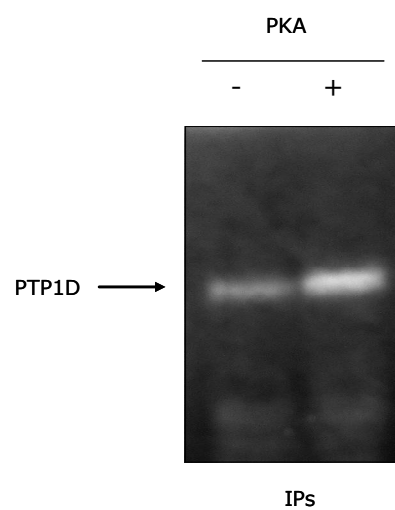
**Figura 17. Fosforilación *in vitro* de PTP1D.** Las proteínas citosólicas de ZF de adrenal de rata se sometieron a ensayos de fosforilación *in vitro* en presencia (+) o ausencia (-) de la subunidad catalítica de PKA y  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Una alícuota del medio de reacción (correspondiente a 100  $\mu\text{g}$  de proteínas), se inmunoprecipitó con un anticuerpo dirigido contra PTP1D. Los inmunoprecipitados (IPs) se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. La figura muestra la autorradiografía de un experimento representativo.

Los antecedentes bibliográficos y los trabajos previos del laboratorio sugerían que la fosforilación por PKA podría incrementar la actividad de PTP1D. Teniendo en cuenta este concepto, se procedió a realizar en paralelo al ensayo descrito anteriormente (Figura 17), la fosforilación de las proteínas citosólicas en ausencia de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (fosforilación "en frío"), en presencia y ausencia de PKA, y la posterior inmunoprecipitación de PTP1D, para luego analizar los inmunoprecipitados en geles de actividad. En la Figura 18 se observa que la actividad del inmunoprecipitado proveniente de proteínas



incubadas en presencia de PKA, es mayor que la del inmunoprecipitado incubado en ausencia de la enzima. Esta observación indica que la fosforilación mediada por PKA promueve la activación de la proteína PTP1D.

En resumen, los resultados descritos en esta sección demuestran que la PTP de 80 kDa de ZF de adrenal de rata que se activa por tratamiento con ACTH es PTP1D. Estos estudios sugieren además, que ACTH podría promover la activación de PTP1D de adrenal de rata a través de eventos de fosforilación mediados por PKA.



**Figura 18. Análisis en geles de actividad de tirosina fosfatasa de inmunoprecipitados de PTP1D provenientes de proteínas citosólicas fosforiladas *in vitro*.** Las proteínas citosólicas de ZF de adrenales de ratas no estimuladas se sometieron a ensayos de fosforilación *in vitro*, en presencia o ausencia de la subunidad catalítica de PKA. Luego de inmunoprecipitar PTP1D, las muestras obtenidas (IPs) (correspondientes a 100  $\mu$ g de proteínas), se analizaron por SDS-PAGE en geles de actividad de tirosina fosfatasa y posterior autorradiografía. La figura muestra la autorradiografía de un experimento representativo.

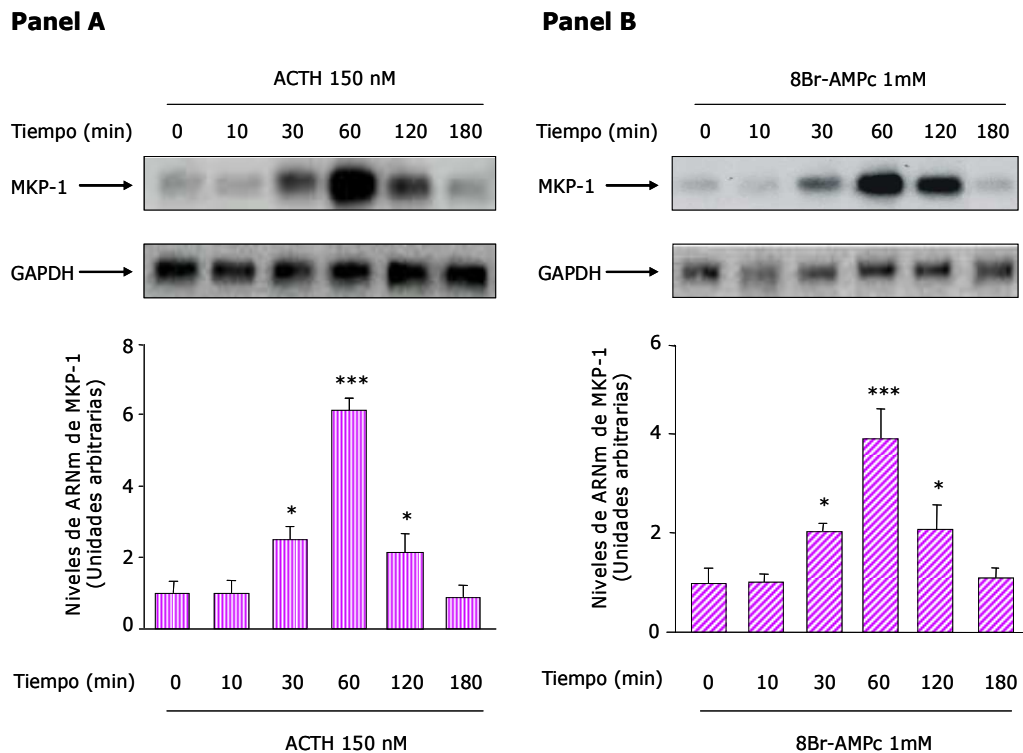
---

## **II. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA FOSFATASA DUAL MKP-1 EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS**

### **II.1 Expresión de MKP-1 en células adrenocorticales y de Leydig: Efecto de la hormona trófica y del AMPc**

Una característica común de las MAPKs, es el requerimiento de fosforilación dual en treonina y tirosina para desarrollar la actividad máxima (Kelly y Chu 2000). Por lo tanto, la regulación de la magnitud y la duración de la actividad de estas proteínas dependen del balance neto entre las actividades de quinasas y fosfatasas específicas. El hecho de que ACTH y LH promuevan la activación de miembros de la familia de las MAPKs (Lotfi y col., 1997; Dewi y col., 2002), sugiere que las fosfatasas específicas para estas quinasas -las MAP quinasas fosfatasas (MKPs)- también podrían ser reguladas por estas hormonas. Para analizar esta hipótesis, se propuso como objetivo analizar si los niveles de expresión de la MAP quinasa fosfatasa-1 (MKP-1), una fosfatasa inducible capaz de desfosforilar a todos los miembros de la familia de las MAPKs, está sujeta a control hormonal en células adrenocorticales y de Leydig.

En primer lugar, se analizó el efecto de la hormona ACTH y del segundo mensajero AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-1 en células adrenocorticales de la línea Y1. Las células fueron arrestadas en la fase G1 del ciclo celular por depleción de suero durante 24 horas, y luego se estimularon con ACTH u 8Br-AMPc durante distintos tiempos. Al término de las incubaciones, las células se procesaron para aislar el ARN total y finalmente analizar los niveles del ARNm de MKP-1 por Northern blot. Se observó que la estimulación con ACTH produce un incremento transitorio en los niveles del ARNm (Figura 19, Panel A). Este efecto es significativo a partir de los 30 minutos, presenta un máximo a la hora de estimulación (6 veces respecto del control) y luego disminuye.

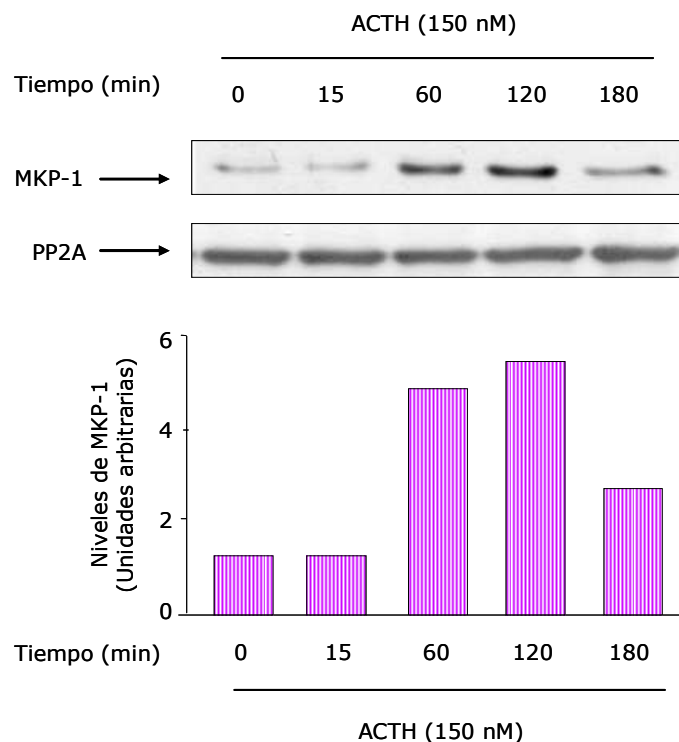


**Figura 19. Efecto de ACTH y AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-1 en células adrenocorticales de la línea Y1.** Las células fueron depletadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con ACTH (150 nM) (Panel A) o con 8Br-AMPC (1mM) (Panel B) por los tiempos indicados. Luego se purificó el ARN total y se analizaron los niveles de ARNm de MKP-1 y GAPDH por Northern blot. En la parte superior de la figura se muestra en cada panel un Northern blot representativo de tres experimentos independientes. Las autorradiografías se cuantificaron por densitometría y la intensidad de la banda específica fue normalizada contra la intensidad de la señal del ARNm de GAPDH. Los gráficos en la parte inferior de cada panel muestran los valores obtenidos (media  $\pm$  DE, n=3) expresados en unidades arbitrarias. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (0 minutos). \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

La estimulación con 8Br-AMPC también incrementa los niveles del ARNm de MKP-1 (4 veces respecto del control a la hora de estimulación) en forma transitoria (Figura 19, Panel B). La cinética de acumulación del ARNm de MKP-1 en respuesta a ACTH y a AMPc resultó ser similar, aunque en este último caso la magnitud del estímulo es menor.

A continuación, se analizaron los niveles de MKP-1 en lisados celulares obtenidos de células Y1 incubadas en presencia de ACTH por varios tiempos, mediante análisis por Western blot. El anticuerpo anti MKP-1 reconoció una

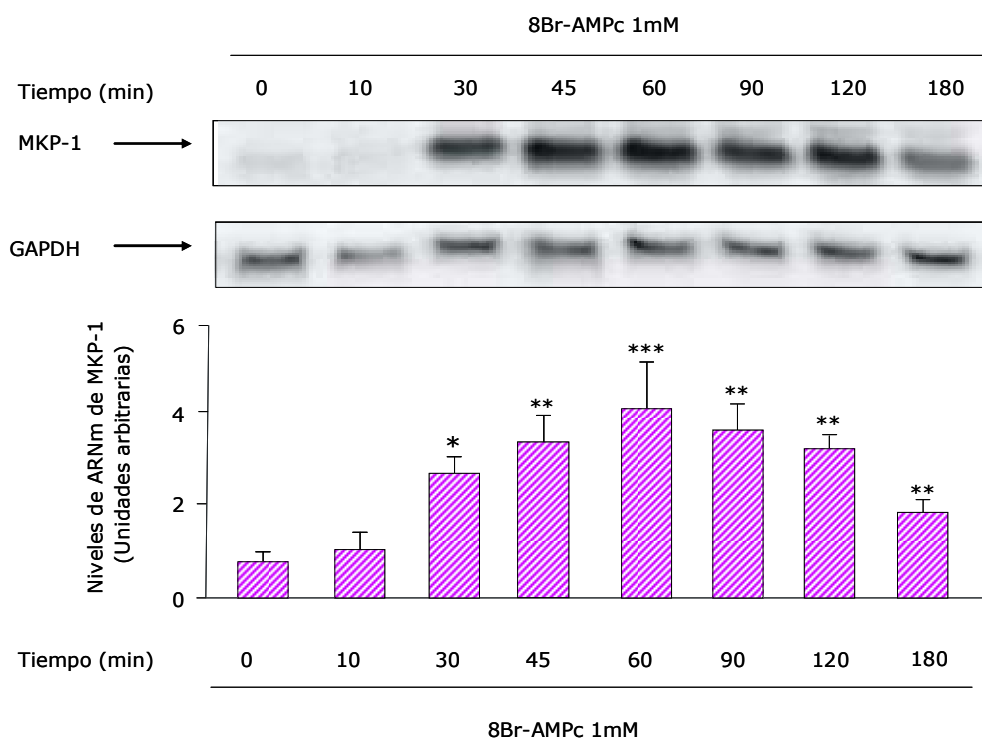
banda que migraba con un peso molecular relativo de 39 kDa, tal como se ha descrito en la literatura (Misra-Press y col., 1995). Como se observa en la Figura 20, el tratamiento con ACTH causó un incremento transitorio en los niveles de la proteína MKP-1, evidente luego de 1 a 2 horas de estimulación.



**Figura 20. Efecto de ACTH sobre los niveles de la proteína MKP-1 en células adrenocorticales de la línea Y1.** Las células fueron depletadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con ACTH (150 nM). Luego las células se lisaron y las proteínas se analizaron por Western blot para la detección de MKP-1. La figura muestra en el panel superior un Western blot representativo. La intensidad de las bandas específicas fue cuantificada por densitometría y normalizada contra la señal de la proteína PP2A. Los datos obtenidos, expresados en unidades arbitrarias están graficados en el panel inferior.

El hecho de que el mecanismo de transducción de señales disparado por las hormonas ACTH y LH incluya eventos comunes, siendo la activación de PKA uno de los más caracterizados, sugiere que en células de Leydig de la línea MA-10, el AMPc también podría ser capaz de provocar la inducción de MKP-1. Es por esto que se procedió a analizar el efecto de la estimulación con 8Br-

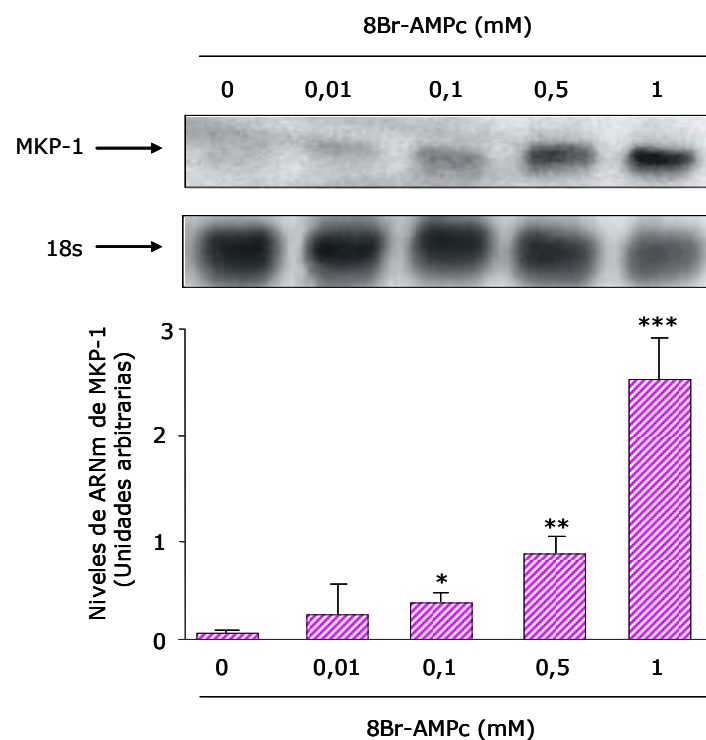
AMPC sobre los niveles de MKP-1 en estas células. El análisis por Northern blot del ARN total reveló un incremento significativo de los niveles del ARNm de MKP-1 luego de 30 minutos de estimulación con 8Br-AMPC (1 mM), presentando un efecto máximo a los 60 minutos (4 veces respecto del control), efecto que disminuye posteriormente (Figura 21).



**Figura 21. Efecto del tiempo de estimulación con 8Br-AMPC sobre los niveles de ARNm de MKP-1 en células de Leydig de la línea MA-10.** Las células fueron depletadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC (1 mM) durante los tiempos indicados. Luego se purificó el ARN total y se analizó por Northern blot para determinar los niveles del ARNm de MKP-1 y de GAPDH. La figura muestra un Northern blot representativo de tres experimentos independientes (Panel superior). Las autorradiografías se cuantificaron por densitometría y la intensidad de la banda fue normalizada contra la intensidad de la señal del ARNm de GAPDH. En el gráfico se observan los valores obtenidos expresados en unidades arbitrarias (media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes) (Panel inferior). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (0 minutos). \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,1$ .

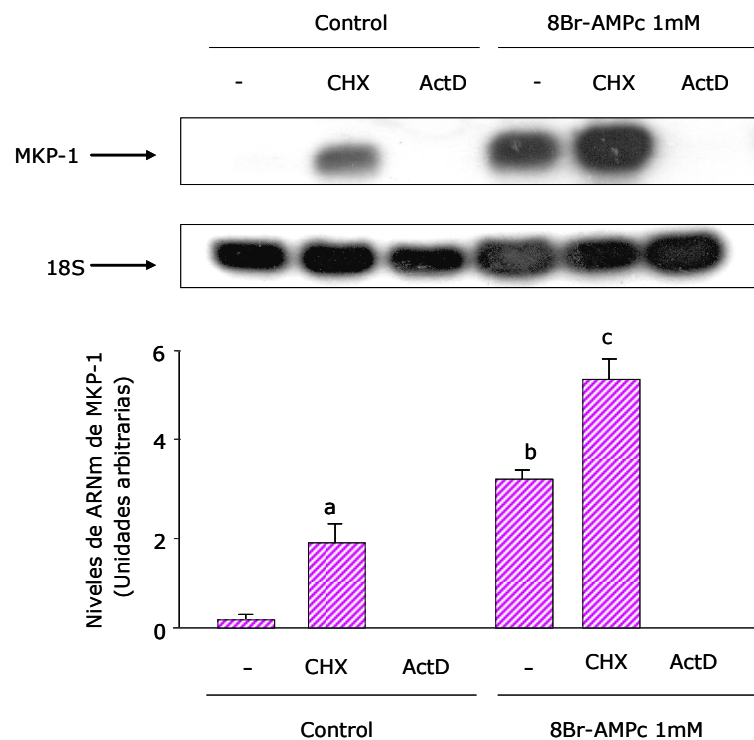
A continuación, se analizó el efecto de la concentración de 8Br-AMPC sobre los niveles del ARNm de MKP-1 en células MA-10. En estos experimentos las células se estimularon durante 1 hora (tiempo de máxima inducción) con

diferentes concentraciones de 8Br-AMPC. Posteriormente las células se procesaron para aislar el ARN total y realizar ensayos de Northern blot. Estos estudios revelaron que una concentración 0,1 mM de 8Br-AMPC es suficiente para producir un incremento significativo en los niveles de ARNm de MKP-1 (1,5 veces respecto del control). La concentración del nucleótido cíclico más alta que se utilizó en los ensayos (1 mM) produjo el máximo efecto de acumulación del ARNm de MKP-1 (4 veces respecto del control) (Figura 22). Los estudios siguientes fueron realizados, salvo que se indique lo contrario, estimulando las células con 8Br-AMPC 1 mM, durante 1 hora.



**Figura 22. Efecto de la concentración de 8Br-AMPC sobre los niveles de ARNm de MKP-1 en células de Leydig de la línea MA-10.** Las células fueron depletadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas durante 1 hora con las concentraciones de 8Br-AMPC indicadas en la figura. Luego se purificó el ARN total y se analizó por Northern blot para determinar del ARNm de MKP-1 y el ARN 18s. La figura muestra un Northern blot representativo de tres experimentos independientes (Panel superior). Las autorradiografías fueron cuantificadas por densitometría y la intensidad de la banda se normalizó contra la intensidad de la señal del ARN 18s. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias y representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes (Panel inferior). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (0 minutos). \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

Con el fin de establecer el origen del incremento en los niveles del mensajero de MKP-1, se analizó el efecto de un inhibidor de la transcripción (Actinomicina D, Act D) sobre los niveles del ARNm de MKP-1 en células MA-10, estimuladas con una concentración de 1 mM de 8Br-AMPC. Dado que MKP-1 es el producto de un gen de expresión temprana y que la estabilidad de los ARN mensajeros correspondientes a este tipo de genes suele depender de la síntesis proteica (Lau y Nathans, 1987), también se analizó el efecto de un inhibidor de este proceso (cicloheximida, CHX) sobre los niveles del ARNm de MKP-1 en células MA-10 estimuladas con 8Br-AMPC.



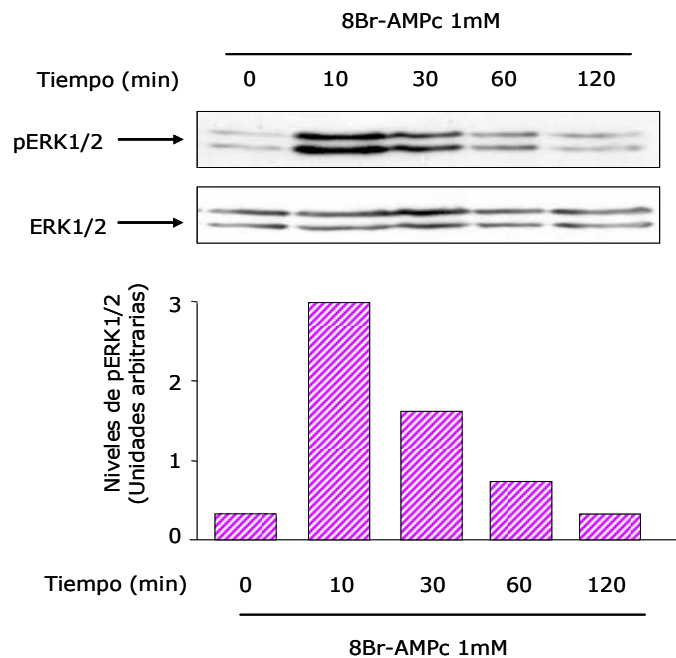
**Figura 23. Efecto de Act D y CHX sobre la inducción del ARNm de MKP-1 en células MA-10.** Las células fueron depletadas de suero durante 24 horas y luego incubadas durante 1 hora con 8Br-AMPC (1 mM) en presencia o ausencia de Act D (5  $\mu$ g/ml) o CHX (2  $\mu$ g/ml) (ambos inhibidores fueron agregados 30 minutos antes del 8Br-AMPC). El ARN total se analizó por Northern blot para determinar los niveles del ARNm de MKP-1 y del ARN 18s. La figura muestra un Northern blot representativo de tres experimentos independientes (Panel superior). Las autorradiografías fueron cuantificadas por densitometría y la intensidad de la banda específica fue normalizada contra la señal del ARN 18s (Panel inferior). Los valores están expresados en unidades arbitrarias y representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. a,  $P < 0,05$ ; b,  $P < 0,001$ ; vs. células no estimuladas incubadas sin CHX; c,  $P < 0,001$  vs. 8Br-AMPC solo.

---

La presencia de Act D en el medio de incubación inhibió completamente el incremento en los niveles del ARNm de MKP-1 disparado por AMPc. Contrariamente, la CHX no impidió la inducción de MKP-1 (Figura 23). Más aún, la CHX incrementó *per se* los niveles del ARNm de MKP-1. Estos resultados indican que el incremento en los niveles de MKP-1 por acción de AMPc se debe a una acción a nivel transcripcional y sugieren que una proteína lábil interfiere con la acumulación del ARNm de MKP-1. Estos resultados fueron concordantes con los descriptos anteriormente empleando células adrenocorticales de la línea Y1 (Bey, Gorostizaga y col., 2003).

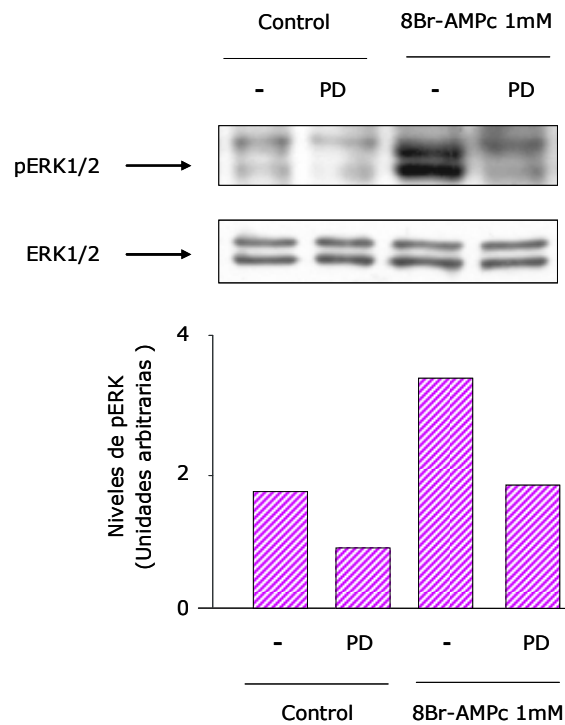
En varios sistemas los mismos estímulos que promueven la activación de las MAPKs también inducen MKP-1 (Kelly y Chu, 2000). Más aún, varios trabajos subrayan la acción de las MAPKs como componentes de las cascadas de señalización que conducen a la inducción de MKP-1 (Cook y col., 1997; Schliess y col., 2000). En células de Leydig MA-10 la estimulación con 8Br-AMPc produce la activación de ERK1/2 (Hirakawa y Ascoli, 2003; Poderoso y col., 2008). Estos resultados se reprodujeron en las condiciones experimentales de este estudio, ya que se determinó un aumento transitorio en los niveles de la formas fosforiladas de ERK1/2 (pERK1/2) en los lisados de células MA-10 estimuladas por diferentes tiempos con 8Br-AMPc (Figura 24). En este contexto se decidió estudiar si la inducción de MKP-1 por 8Br-AMPc es dependiente de la activación de ERK1/2 en este tipo celular.





**Figura 24. Efecto del 8Br-AMPC sobre la activación de ERK1/2 en células de Leydig de la línea MA-10.** Las células fueron depletadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC (1 mM) durante los tiempos indicados. Posteriormente se obtuvieron los lisados celulares para el análisis por Western blot de los niveles de pERK1/2 y ERK1/2 (total). La figura muestra en el panel superior un Western blot representativo (Panel superior). La intensidad de cada banda fue cuantificada por densitometría y normalizada contra la correspondiente señal de ERK total. El gráfico en la parte inferior de la figura muestra los valores obtenidos expresados en unidades arbitrarias.

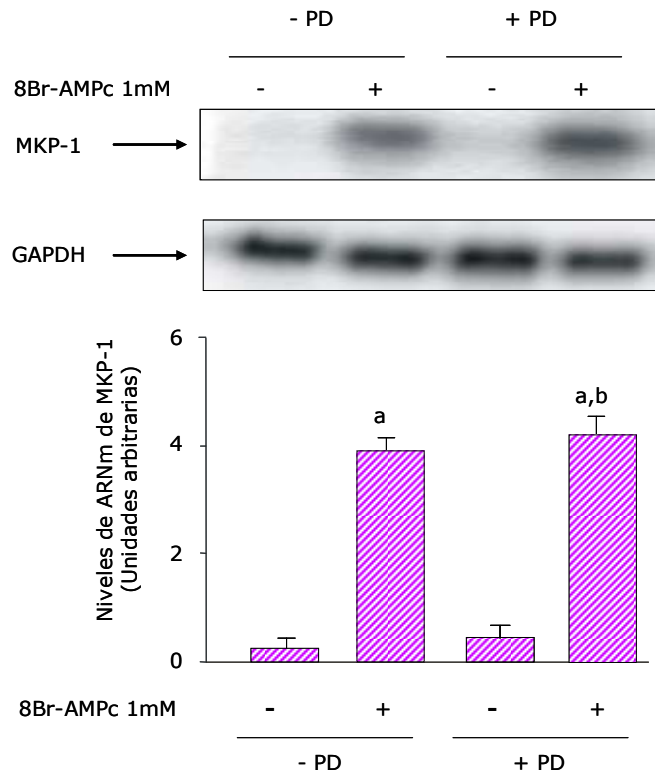
Con el fin de determinar si la inducción de MKP-1 gatillada por AMPC es dependiente de la actividad de ERK1/2, se investigó la capacidad del 8Br-AMPC de inducir la expresión de MKP-1 en condiciones en las que se bloquea la activación de ERK1/2 con el compuesto PD98059 (PD), un inhibidor de MEK (quinasa que activa a ERK1/2). En paralelo, y como control de la efectividad del inhibidor utilizado, se determinó el efecto del PD sobre la activación de ERK1/2 promovida por 8Br-AMPC (Figura 25). El análisis por Western blot mostró que 10 minutos de estimulación producen un marcado incremento en los niveles de pERK1/2 y que el compuesto PD inhibe este efecto (Figura 25).



**Figura 25. Efecto del PD98059 sobre los niveles de pERK1/2 en células de Leydig de la línea MA-10 estimuladas con 8Br-AMPC.** Las células fueron depletadas de suero durante 24 horas y luego incubadas 10 minutos con 8Br-AMPC (1 mM) en presencia o ausencia de PD98059 (PD, 50  $\mu$ M). El inhibidor fue agregado 30 minutos antes del 8Br-AMPC). Posteriormente las células fueron lisadas y las proteínas fueron analizadas por Western blot para la detección secuencial de las formas fosforiladas de ERK1/2 y ERK1/2 (total). En la parte superior de la figura se muestra un Western blot representativo. La intensidad de las bandas específicas fue cuantificada por densitometría y normalizada contra la señal de ERK1/2 total. Los valores obtenidos, expresados en unidades arbitrarias, se muestran en el gráfico de la parte inferior de la figura.

Se analizaron luego los niveles del ARNm de MKP-1 de células estimuladas con 8Br-AMPC en presencia de PD98059 (50  $\mu$ M) y en ausencia del mismo. El análisis por Northern blot mostró que el 8Br-AMPC incrementa los niveles del mensajero correspondiente a MKP-1 y que el inhibidor PD98059 no modifica la magnitud de este efecto (Figura 26).

El hecho de que un tratamiento efectivo para reducir la activación de ERK1/2 promovida por 8Br-AMPC no reduzca la acción de este nucleótido sobre los niveles del ARNm de MKP-1, sugiere que el mecanismo por el cual el AMPc dispara la inducción de MKP-1 no involucra la actividad de ERK1/2.



**Figura 26. Efecto del PD98059 sobre los niveles de ARNm inducidos por AMPc en células de Leydig de la línea MA-10.** Las células fueron depletadas de suero durante 24 horas y luego incubadas 1 hora con 8Br-AMPC (1 mM) en presencia o ausencia de PD98059 (PD, 50  $\mu$ M). El ARN se analizó por Northern blot para determinar los niveles del ARNm de MKP-1 y de 18s. En la parte superior de la figura se muestran Northern blots representativos de tres experimentos independientes. Las autorradiografías fueron cuantificadas por densitometría y la intensidad de la banda específica fue normalizada contra la intensidad de la señal del ARN 18s. En la parte inferior de la figura se muestra el gráfico de los valores obtenidos, expresados en unidades arbitrarias (media  $\pm$  DE, n=3). a,  $P < 0,001$  vs. células no estimuladas; b, ns vs. células estimuladas no tratadas con PD.

En resumen, los resultados obtenidos en esta parte del trabajo indican que, en células de adrenocorticales de la línea Y1 y de Leydig de la línea MA-10, el AMPc provoca un aumento de los niveles del ARNm de MKP-1 en forma rápida y transitoria por una acción a nivel transcripcional. Estos resultados evidencian la potencialidad de las hormonas esteroideogénicas ACTH y LH para promover tanto la activación de las MAPKs como la expresión de una fosfatasa capaz de desactivarlas.

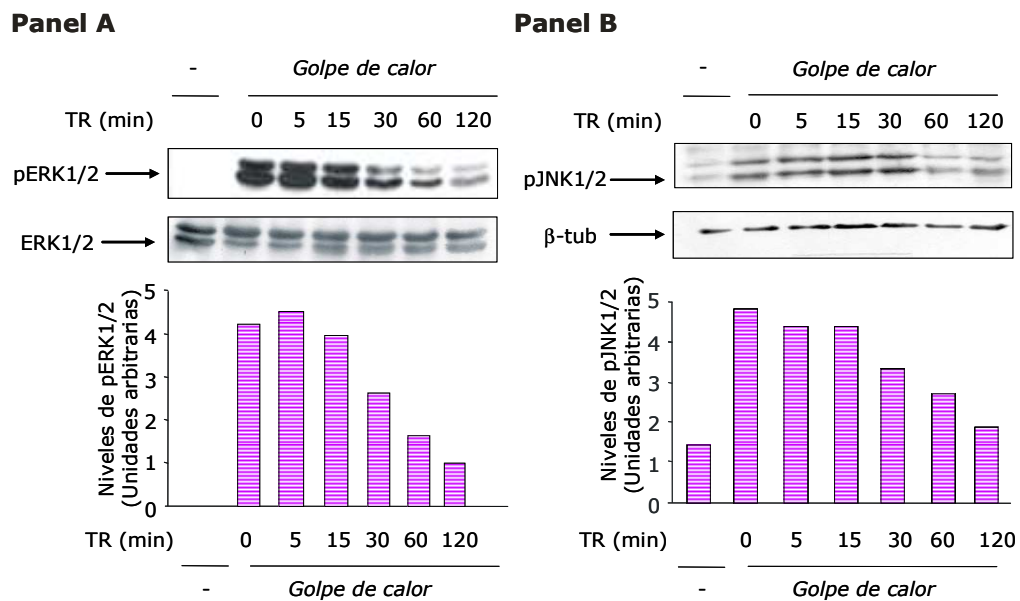
---

## **II.2. Expresión de MKP-1 en células adrenocorticales y de Leydig:** **Efecto del estrés por calor**

Numerosos trabajos describen la inducción transcripcional de la proteína MKP-1 mediada por agentes estresantes (Li y col., 1999; Mishra y Delivoria-Papadopoulos, 2004; Kim y col., 2005). El *golpe de calor* es una condición de estrés que afecta varias funciones celulares como consecuencia de modificaciones provocadas por el calor en la estructura y/o la función de distintas proteínas. El estrés por calor resulta particularmente interesante considerando los tipos celulares utilizados como modelo experimental para este trabajo, dado que la esteroidogénesis en células de Leydig es afectada severamente por esta situación (Liu y Stocco, 1997; Murphy y col., 2001). Estudios realizados utilizando células de Leydig de la línea MA-10 han demostrado que la exposición de las células a un protocolo de *golpe de calor* que consta de 10 minutos a 45 °C, reduce transitoria y drásticamente los niveles de esteroides producidos por estimulación hormonal (Murphy y col., 2001), como consecuencia de una acción a nivel de la inducción de la proteína StAR (Liu y Stocco, 1997). Sin embargo, en células de Leydig no está ampliamente estudiado el camino de señalización activado por estrés por calor que lleva a los eventos mencionados. Por otra parte, no se han descrito los mecanismos moleculares que expliquen las diferencias en cuanto a la susceptibilidad que muestran los distintos tipos de células esteroidogénicas frente al estrés por calor.

Dado que MKP-1 es regulada a nivel transcripcional por AMPc en células adrenocorticales y de Leydig, y que esta fosfatasa podría modular la esteroidogénesis por su acción sobre las MAPKs, resultó de interés conocer si un tipo de estrés que afecta la esteroidogénesis provoca un cambio en los niveles de expresión de MKP-1. Era posible especular que el estrés por calor gatillara un incremento de MKP-1, de modo que esta proteína redujera el efecto de la estimulación hormonal, producida luego del estrés, sobre el grado de activación de ERK1/2 y la producción de esteroides. En un modelo así, las células de diferente sensibilidad al estrés por calor podían exhibir diferencias en cuanto al nivel de expresión de MKP-1 inducido por este tipo de estrés.

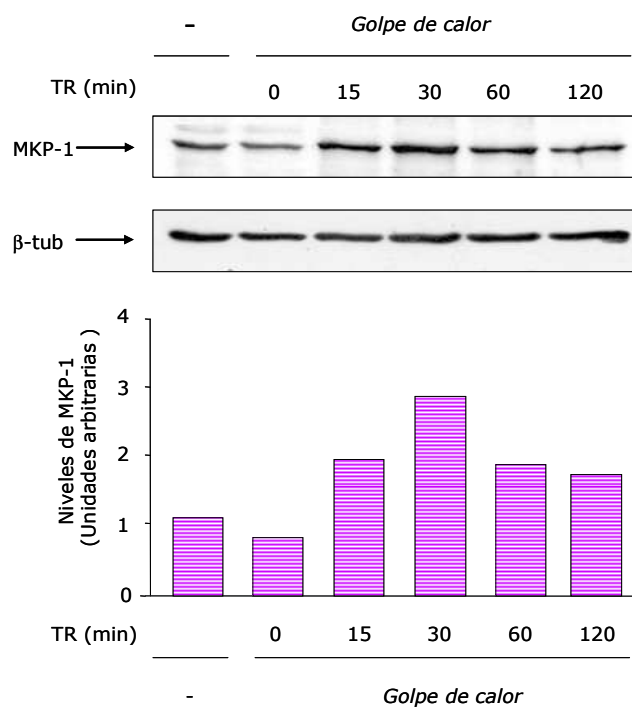
Con el propósito de aportar conocimiento sobre los eventos que dispara el estrés por calor en células de Leydig, se examinaron particularmente dos puntos: la fosfo-desfosforilación de las MAPKs y la inducción de MKP-1. Debido a que los niveles de la proteína MKP-1 se incrementan por los mismos estímulos que promueven la activación de las MAPKs en varios sistemas, se optó por estudiar en primera instancia los efectos del *golpe de calor* sobre el grado de activación de las MAPKs en células de Leydig de la línea MA-10. Para esto las células se sometieron a un protocolo de *golpe de calor*, como se indica en Materiales y Métodos. A continuación, se estudió la cinética de activación de las MAPKs, ERK1/2, JNK y p38, a diferentes tiempos luego del estrés por calor (tiempo de recuperación, TR). Para esto se determinaron por Western blot los niveles de las formas fosforiladas de estas enzimas (pERK1/2, pJNK1/2, y pp38) (Figura 27).



**Figura 27. Efecto del estrés por calor sobre la actividad de las MAPKs en células de Leydig de la línea MA-10.** Las células fueron incubadas a 37 °C durante el transcurso del experimento (control), o sometidas a *golpe de calor* (10 minutos, 45 °C) y luego incubadas a 37 °C durante los tiempos indicados (TR). Luego las células se lisaron y las proteínas se analizaron por Western blot para la detección secuencial de pERK1/2 (Panel A) y pJNK1/2 (Panel B). La figura muestra en la parte superior de cada panel un Western blot representativo. La intensidad de las bandas específicas fue cuantificada por densitometría y normalizada contra la señal de ERK total (Panel A) o  $\beta$ -tubulina (Panel B) respectivamente. Los valores obtenidos, expresados en unidades arbitrarias están graficados al pie de la figura.

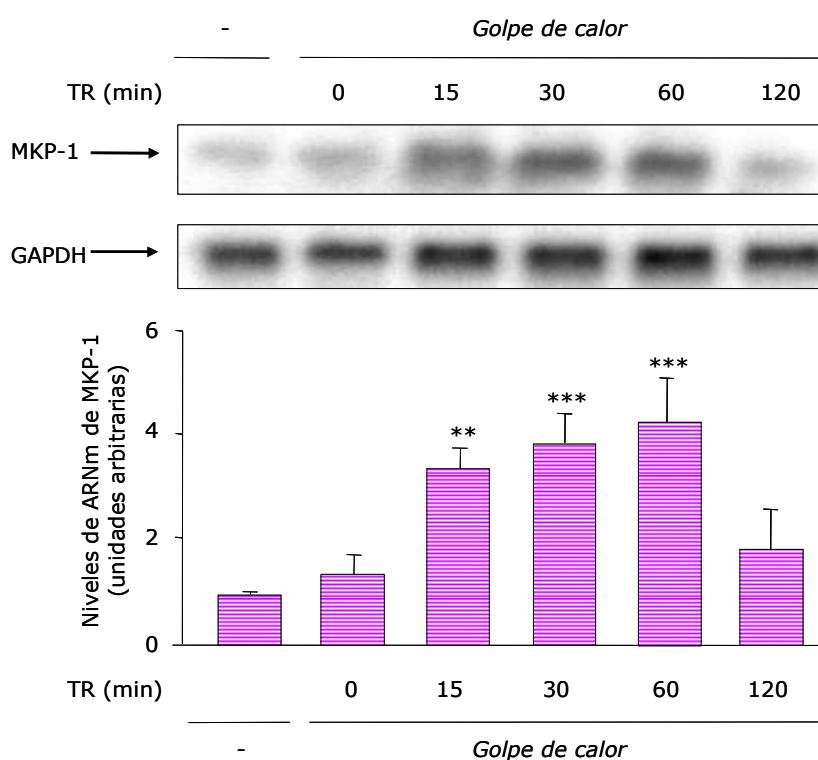
Este análisis reveló que el *golpe de calor* promueve la activación de ERK1/2 y de JNK con cinética similar, registrándose un máximo a los 5 minutos que disminuye posteriormente (Figura 27, Paneles A y B). Por el contrario, no se detectaron cambios apreciables sobre los niveles de pp38 por efecto del *golpe de calor* (estos resultados no se incluyeron).

A continuación, se examinó el efecto del estrés por calor sobre los niveles de la proteína MKP-1. El análisis por Western blot reveló que el *golpe de calor* produce un aumento transitorio en los niveles de la proteína, alcanzando un máximo luego de 30 minutos de recuperación a 37 °C que disminuye posteriormente (Figura 28). El aumento observado fue de 2,5 a 3 veces respecto del control.



**Figura 28. Efecto del estrés por calor sobre los niveles de la proteína MKP-1 en células de Leydig de la línea MA-10.** Las células fueron incubadas a 37 °C durante el transcurso del experimento (control) o sometidas a *golpe de calor* y luego incubadas a 37 °C durante los tiempos indicados (tiempo de recuperación, TR). Luego las células se lisaron y las proteínas se analizaron por Western blot para determinar los niveles de la proteína MKP-1 y de  $\beta$ -tubulina. La figura muestra un Western blot de un experimento representativo (Panel superior). La intensidad de las bandas específicas fue cuantificada por densitometría y normalizada contra la señal de  $\beta$ -tubulina. El gráfico muestra los valores obtenidos, expresados en unidades arbitrarias.

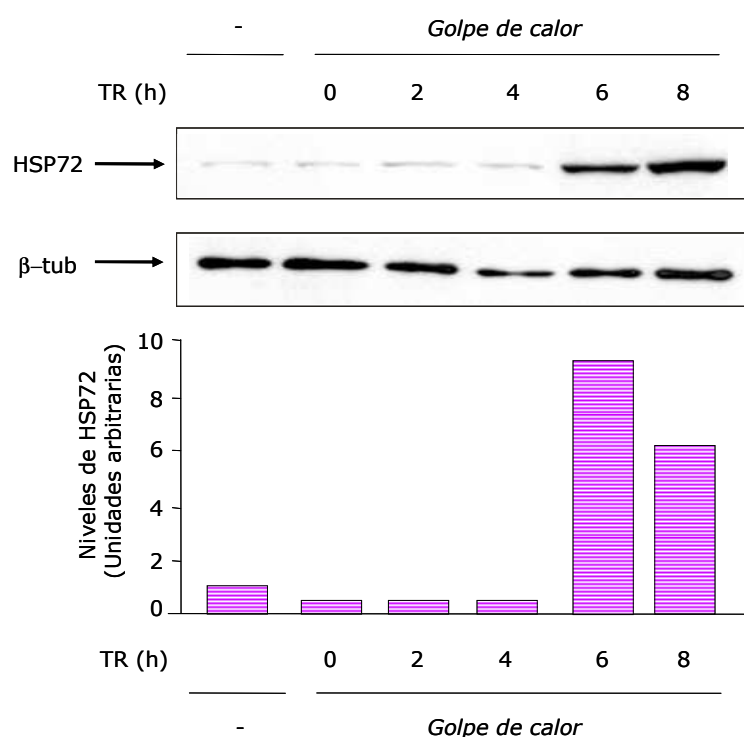
Seguidamente, se analizó si el estrés por calor produce un efecto sobre la acumulación del mensajero de MKP-1. El análisis por Northern blot indicó que el *golpe de calor* produce un aumento significativo en los niveles del ARNm de MKP-1 luego de 15 minutos de recuperación a 37 °C. El efecto alcanza un máximo (3,5 veces respecto del control) luego de 60 minutos de producido el *golpe de calor* y disminuye posteriormente (Figura 29). Estos resultados sugieren que el incremento en los niveles de la proteína podría deberse a una acción a nivel transcripcional, sin descartar otros mecanismos.



**Figura 29. Efecto del estrés por calor sobre los niveles de ARNm de MKP-1.**

Las células fueron incubadas a 37 °C durante el transcurso del experimento (control), o sometidas a *golpe de calor* y luego incubadas a 37 °C durante los tiempos indicados (tiempo de recuperación, TR). El ARN total se purificó y se analizó por Northern blot para determinar los niveles del ARNm de MKP-1 y de GAPDH. La figura muestra un Northern blot representativo de tres experimentos independientes (Panel superior). Las autorradiografías fueron cuantificadas por densitometría y la intensidad de la banda específica fue normalizada contra la intensidad de la señal del ARNm de GAPDH. El gráfico muestra los valores obtenidos, expresados en unidades arbitrarias. Cada valor representa la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes (Panel inferior). \*\*  $P < 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,001$  vs. células controles (no sometidas a *golpe de calor*).

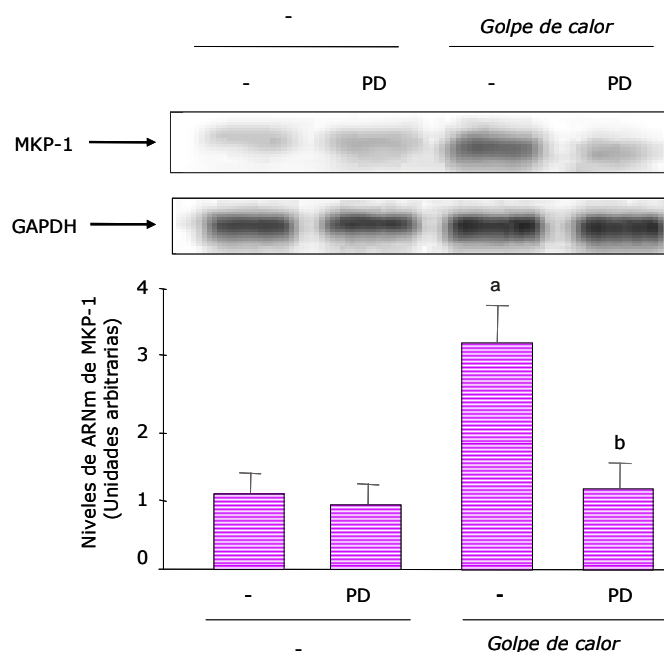
La respuesta celular al estrés por calor incluye la inducción de proteínas que se denominan proteínas del *golpe de calor* o **Heat Shock Proteins** (HSPs). Estas proteínas tienen función de chaperonas moleculares y se acumulan luego del estrés por calor u otro tipo de estrés y son cruciales para la supervivencia de las células luego de la injuria. Por este motivo se evaluó la cinética de la inducción mediada por calor de HSP72, una proteína inducible con una función relevante durante el estrés por calor (Morimoto y col., 1997). El análisis por Western blot reveló que la exposición de las células al estrés por calor provoca un aumento en los niveles de la proteína HSP72 (6 a 9 veces respecto del control) tras 6 horas de recuperación luego del *golpe de calor* (Figura 30).



**Figura 30. Efecto del estrés por calor sobre los niveles de la proteína HSP72 en células de Leydig de la línea MA-10.** Las células fueron incubadas a 37 °C, o sometidas a *golpe de calor* y luego incubadas a 37 °C durante los tiempos indicados (tiempo de recuperación). Posteriormente se lisaron las células y las proteínas se analizaron por Western blot para determinar los niveles de la proteína HSP72 y  $\beta$ -tubulina. La figura muestra un Western blot representativo de tres experimentos independientes (Panel superior). La intensidad de las bandas específicas fue cuantificada por densitometría y normalizada contra la señal de  $\beta$ -tubulina. En el panel inferior se muestra el gráfico de los valores correspondiente expresados en unidades arbitrarias.

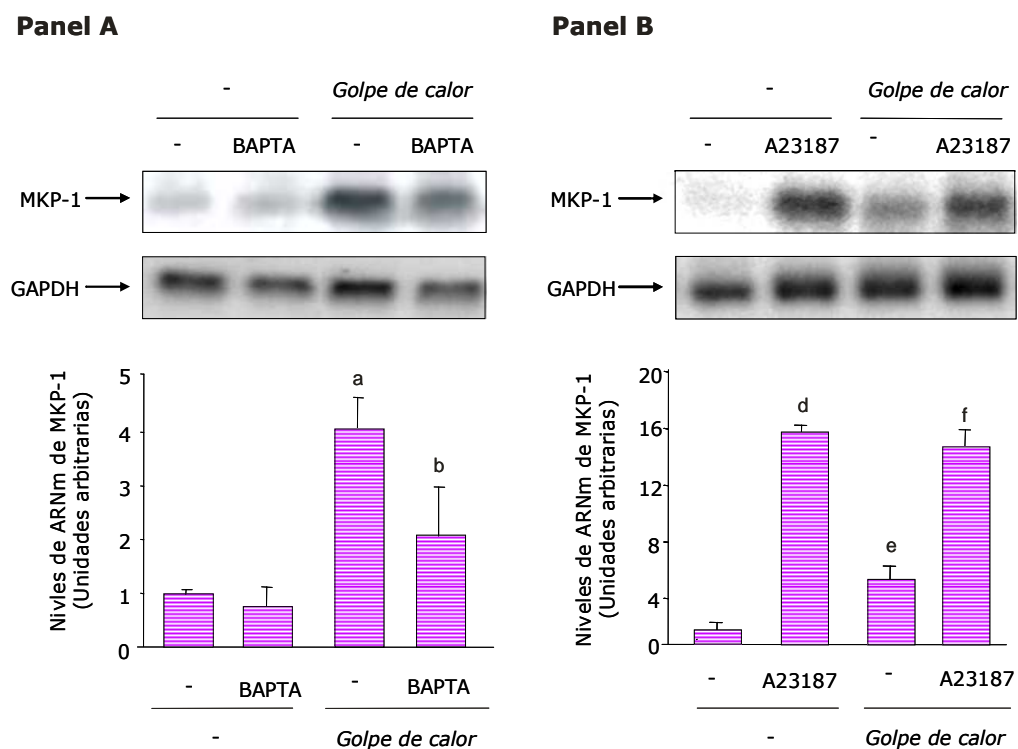


Para estudiar las bases moleculares de la inducción del gen de MKP-1 en respuesta al estrés por calor en células de Leydig de la línea MA-10 se empleó una estrategia farmacológica. Se evaluaron los niveles del ARNm de MKP-1 en células expuestas a *golpe de calor* en presencia o ausencia de inhibidores apropiados. La detección del ARNm por Northern blot, se realizó a los 60 minutos de producido el estrés por calor, tiempo en el que se observa la máxima inducción de la proteína. Para estudiar el papel de la vía de ERK1/2 en la inducción transcripcional de MKP-1 se utilizó PD98059. El análisis por Northern blot reveló que este compuesto suprime el efecto del *golpe de calor* sobre los niveles del mensajero de MKP-1 (Figura 31), indicando que la activación de ERK1/2 mediada por MEK1/2 está implicada en el incremento de los niveles del ARNm de MKP-1 por estrés por calor.



**Figura 31. Papel de la actividad de MEK-ERK1/2 en la inducción de MKP-1 por estrés por calor en células MA-10.** Las células fueron incubadas a 37 °C, o sometidas a *golpe de calor* y luego incubadas a 37 °C durante 1 hora. Las incubaciones se realizaron en presencia o ausencia de 50  $\mu$ M de PD98059 (PD). Se purificó el ARN total y se analizó por Northern blot para determinar los niveles del ARNm de MKP-1 y de GAPDH. La figura muestra un Northern blot representativo de tres experimentos independientes (Panel superior). Las autorradiografías fueron cuantificadas por densitometría y la intensidad de la banda fue normalizada contra la señal del ARNm de GAPDH. En el panel inferior se grafican los valores que representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes, expresados en unidades arbitrarias. (a)  $P < 0.01$  vs. Golpe de calor - sin PD; (b)  $P < 0.01$  vs. Golpe de calor + sin PD.

En diferentes tipos celulares el  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión de MKP-1 (Scimeca y col., 1997; Ryser y col., 2001). Con ese antecedente se procedió a estudiar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de la expresión del gen de MKP-1 por acción del calor en células de Leydig de la línea MA-10. Con este fin, se evaluaron los efectos del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 y del quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA-AM, sobre los niveles de ARNm de MKP-1 que se alcanzan a la hora de ocurrido el *golpe de calor* (Figura 32).



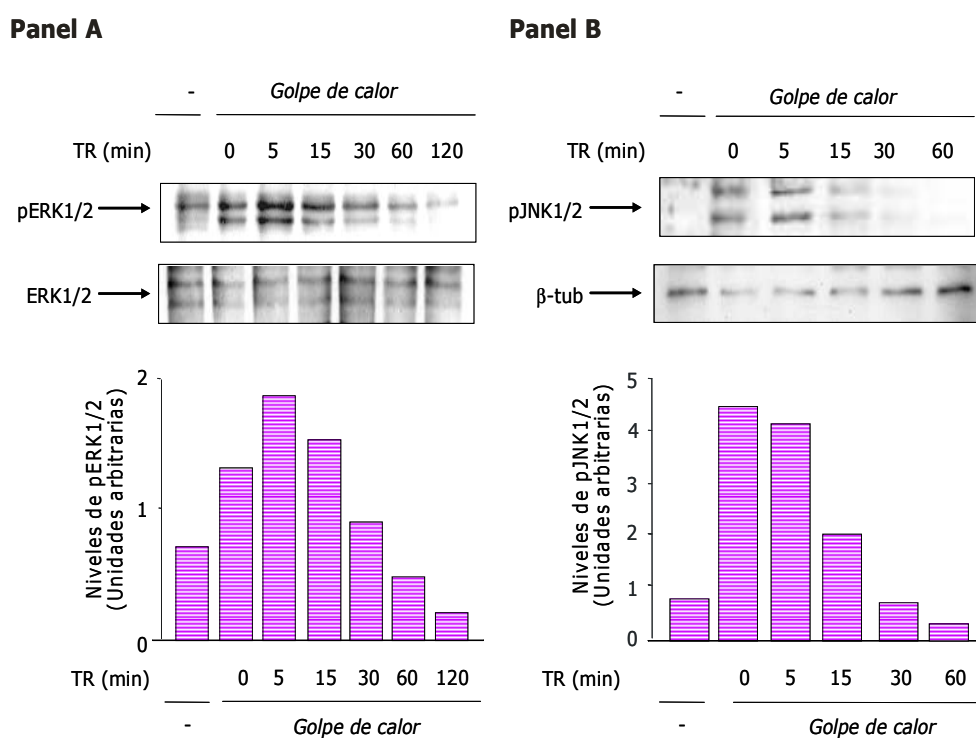
**Figura 32. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la inducción del ARNm de MKP-1 por estrés por calor en células MA-10.** Las células fueron incubadas a 37 °C durante el transcurso del experimento (control), o sometidas a *golpe de calor* y luego incubadas a 37 °C (1 hora). Estas incubaciones se realizaron en presencia o ausencia de A23187 10  $\mu\text{M}$  (Panel A) o BAPTA-AM 10  $\mu\text{M}$  (Panel B) (1h a 37 °C). Se purificó el ARN total y se analizó por Northern blot para determinar los niveles del ARNm de MKP-1 y GAPDH. La figura muestra un Northern blot representativo de tres experimentos independientes (Paneles A y B, parte superior). Las autorradiografías se cuantificaron por densitometría y la intensidad de la banda específica fue normalizada contra la intensidad de la señal del ARNm de GAPDH. En la parte inferior de cada panel se muestra el gráfico correspondiente a los valores expresados en unidades arbitrarias (media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes). (a)  $P < 0.01$  vs. *golpe de calor* - sin BAPTA, (b)  $P < 0,05$  vs. *golpe de calor* +; (c)  $P < 0,001$  vs. *golpe de calor* -, (d)  $P < 0,05$  vs. *golpe de calor* sin A23187, (e)  $P < 0,001$  vs. *golpe de calor* +.

---

El análisis por Northern blot reveló que el ionóforo A23187 aumenta marcadamente la inducción de MKP-1 mediada por calor (Figura 32, Panel A). Sin embargo, la magnitud de esta respuesta es similar a la producida por el ionóforo solo. Este resultado, sumado al hecho de que el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular BAPTA-AM reduce notablemente los niveles del ARNm de MKP-1 inducidos por el *golpe de calor* (Figura 32, Panel B), indican que el  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario y suficiente para disparar la inducción MKP-1 en células MA-10. Sin embargo los resultados obtenidos no son suficientes para establecer si el estrés por calor implica un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

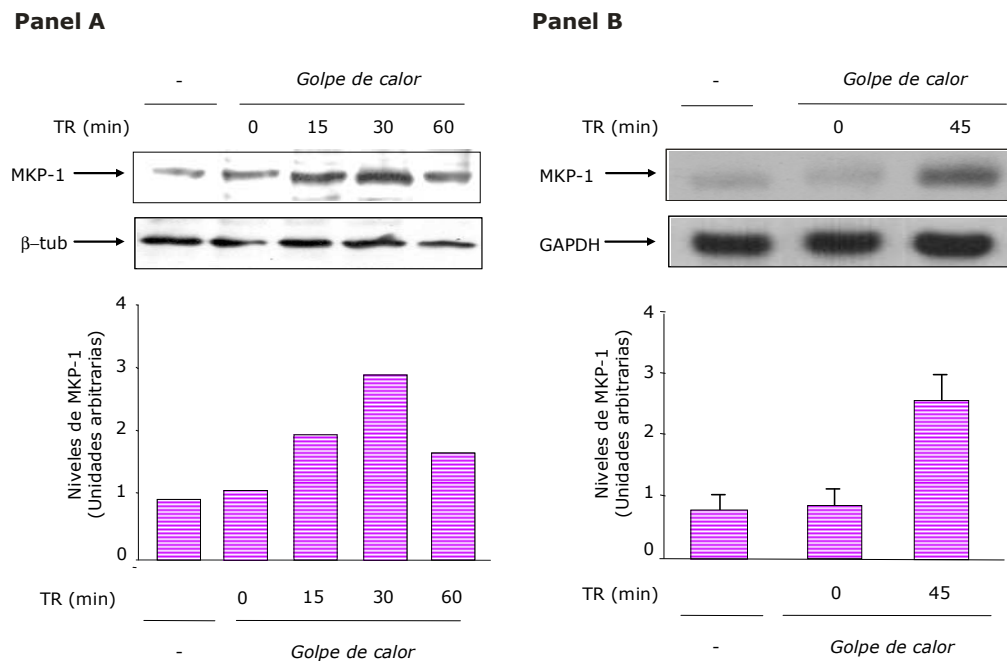
Está descrito que las células de Leydig son particularmente sensibles al estrés por calor, al menos en lo que se refiere a la capacidad de sintetizar esteroides (Liu y Stocco, 1997). Por lo tanto si la inducción de MKP-1 cumpliera un papel respecto de esta mayor sensibilidad, es esperable que el *golpe de calor* produzca un efecto diferente sobre la fosforilación y desfosforilación de las MAPKs en otro tipo celular que sintetiza esteroides y que son menos sensibles al estrés por calor. Para estudiar esta posibilidad se evaluaron los efectos del estrés por calor en células adrenocorticales de la línea Y1.

En primer lugar se estudió la cinética de activación de las MAPKs, ERK1/2, JNK, y p38 en células adrenocorticales de la línea Y1. Se analizaron por Western blot los niveles de las formas fosforiladas de las mismas utilizando anticuerpos específicos (Figura 33). Se pudo comprobar que en células Y1 el estrés por calor promueve la activación rápida de las MAPKs, ERK1/2 (Figura 33, Panel A), y JNK1/2 (Figura 33, Panel B) y no modifica, al menos notoriamente, los niveles de pp38 (datos no mostrados).



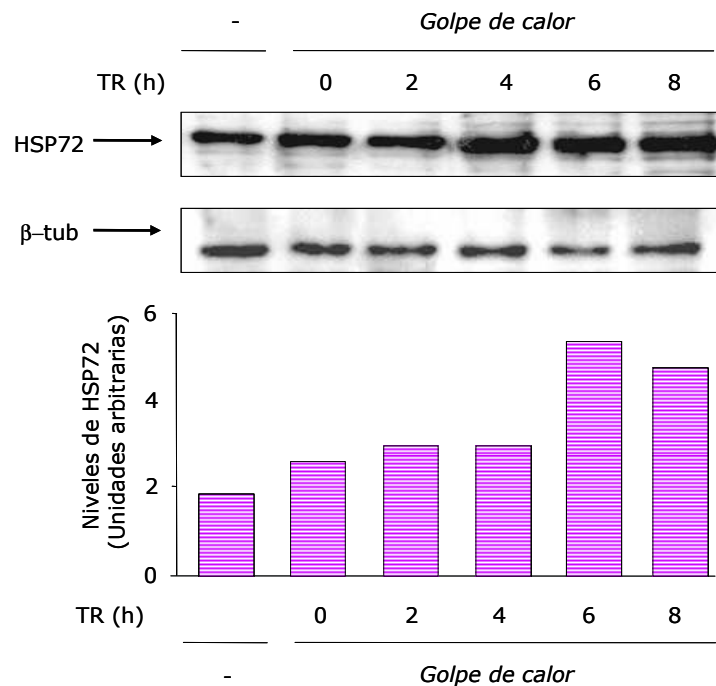
**Figura 33. Efecto del estrés por calor sobre la actividad de las MAPKs en células adrenocorticales de la línea Y1.** Las células fueron incubadas a 37 °C durante el transcurso del experimento (control), o sometidas a golpe de calor (10 minutos, 45 °C) y luego incubadas a 37 °C durante los tiempos indicados (tiempo de recuperación). Luego las células se lisaron y las proteínas se analizaron por Western blot para la detección secuencial de pERK1/2 (Panel A) y pJNK1/2 (Panel B). La figura muestra en la parte inferior de cada panel un Western blot representativo de tres experimentos independientes. La intensidad de las bandas específicas fue cuantificada por densitometría y normalizada contra la señal de ERK total (Panel A) o  $\beta$ -tubulina (Panel B) respectivamente. En la parte inferior de cada panel se muestran los gráficos de las correspondientes densitometrías cuyos valores se expresan en unidades arbitrarias.

Seguidamente se examinaron los niveles de la proteína MKP-1 y de su correspondiente ARNm, por Western blot y Northern blot respectivamente en el mismo tipo celular. Los resultados obtenidos muestran que, al igual que en células MA-10, los niveles de la proteína MKP-1 aumentan luego de 30 minutos de producida la injuria por calor (3 veces respecto del control) (Figura 34, Panel A). Este incremento se observa también en los niveles del ARNm, ya que a los 45 minutos de producido el estrés se detectan niveles del ARNm 3 veces superiores a los registrados en las células no expuestas al calor (*golpe de calor* -) (Figura 34, Panel B).



**Figura 34. Efecto del estrés por calor sobre los niveles de la proteína MKP-1 y su ARNm en células adrenocorticales de la línea Y1.** Las células fueron incubadas a 37 °C durante el transcurso del experimento (control), o sometidas a golpe de calor (10 minutos, 45 °C) y luego incubadas a 37 °C durante los tiempos indicados (TR). Se lisaron las células y se analizaron las proteínas por Western blot para determinar los niveles de la proteína MKP-1 y  $\beta$ -tubulina (Panel A) o se purificó el ARN total y se analizó por Northern blot para determinar los niveles del ARNm de MKP-1 y de GAPDH. En la parte superior de la figura se muestran un Western blot (Panel A) y un Northern blot representativos de tres experimentos independientes. En la parte inferior de cada panel se muestra el gráfico correspondiente a los valores expresados en unidades arbitrarias (media  $\pm$  DE) de tres experimentos independientes. Panel B: \*\* P < 0,01 y \*\*\* P < 0,001 vs. células controles (*golpe de calor* -).

Se estudió luego la cinética de inducción de la proteína HSP72 por el *golpe de calor*. El análisis por Western blot reveló que la exposición de las células a estrés por calor incrementa los niveles de esta proteína (Figura 35). No obstante, en este tipo celular el aumento observado en los niveles de HSP72 parece ser menos notorio que en células MA-10.



**Figura 35. Efecto del estrés por calor sobre los niveles de la proteína HSP72.** Las células adrenocorticales de la línea Y1 fueron cultivadas a 37°C o sometidas a *golpe de calor* y luego incubadas a 37°C para su recuperación por los tiempos indicados. Se analizaron las proteínas de los lisados celulares por Western blot para determinar los niveles de la proteína HSP72 y  $\beta$ -tubulina (control de carga). La figura muestra un Western blot representativo (Panel superior) y la correspondiente cuantificación de las señales específicas normalizadas contra el control de carga y expresadas en unidades arbitrarias (Panel inferior).

En síntesis, los resultados obtenidos muestran que las células MA-10 y Y1 se comportan de manera similar en cuanto al mecanismo de transducción de señales que disparan frente al estrés por calor, al menos en lo que respecta a las MAPKs y MKP-1. Estudios más exhaustivos podrán establecer si un perfil de expresión de MKPs particular (MKP-1, MKP-2 y MKP-3) o una regulación post-traduccionaI diferente de estas enzimas está relacionado con la diferente susceptibilidad al calor que exhiben los distintos tipos de células esteroideogénicas.

## ***DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES***

Los efectos que producen las hormonas de la corteza suprarrenal son diversos e incluyen alteraciones del metabolismo, conservación del equilibrio de líquidos y electrolitos, y preservación de la función normal del sistema inmune, entre otras. Además, los corticosteroides permiten al organismo resistir circunstancias que generan estrés, como estímulos nocivos y cambios ambientales. Esto explica la existencia de mecanismos apropiados para controlar en forma armónica y eficiente la producción de las hormonas de la corteza adrenal. La hormona ACTH es el principal regulador del crecimiento y la secreción adrenocortical. La regulación hormonal de ambas actividades – trófica y endócrina- se ejerce básicamente por la acción de PKA. La unión de la hormona al receptor dispara una red de señales reguladoras interconectadas que permiten un control estricto y coordinado de procesos que ocurren a diferentes tiempos de producido el estímulo y en diferentes compartimientos celulares. Un tipo de señales de muy reciente caracterización, que participan en el mecanismo de acción de ACTH, es la desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina mediante la acción de fosfatasas de tirosina reguladas por PKA. Esta señalización es un evento que también funciona como componente del mecanismo de acción de otra hormona que regula la producción de esteroides, como la hormona LH.

Luego de describir la desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina por acción hormonal en células adrenocorticales y de Leydig (Vilgrain y col., 1998; Paz y col., 1999; Maciel y col., 2001), surgieron trabajos que demostraban la participación necesaria de estos procesos en la regulación de la producción de esteroides (Paz y col., 2002; Sewer y Waterman, 2002). Sin embargo, aún cuando se infería un papel funcional de las tirosina fosfatasas en la regulación de la producción de hormonas esteroides, la información acerca de las enzimas involucradas era limitada. Esta realidad restringía la posibilidad de incrementar los conocimientos acerca de la función exacta de estas enzimas en la biología de las células esteroideogénicas y, en particular, en el control hormonal de la esteroideogénesis.

El panorama descrito ponía en evidencia que la identificación de fosfatasas de tirosina de actividad y/o expresión dependiente de hormona, en células adrenocorticales y de Leydig, era un requisito para determinar –en una etapa posterior- el papel funcional de estas enzimas. En base a esta



consideración es que el objetivo general de este trabajo fue identificar dos de las tirosina fosfatasas de ZF de adrenal de rata, que se conocía que eran activadas por ACTH/PKA, de 115 y 80 kDa, y determinar si la acción de las hormonas tróficas correspondientes regulan la expresión de una fosfatasa dual como MKP-1 en células adrenocorticales y de Leydig.

Los trabajos desarrollados en el marco de este trabajo de Tesis permitieron identificar a las tirosina fosfatasas PTP-PEST y PTP1D como blanco de la acción de ACTH en ZF de adrenal de rata. Ambas enzimas se describen como proteínas citosólicas de expresión ubicua (Garton y Tonks, 1994; Stoker, 2005), capaces de desfosforilar *in vivo* tanto a la paxilina como a otras proteínas del citoesqueleto, en una variedad de tipos celulares (Angers-Loustau y col., 1999; Inagaki y col., 2000; Shen y col., 2000; Lyons y col., 2001; Fernstrom y col., 2005). Previamente se había demostrado que ACTH incrementa la actividad de tirosina fosfatasas de identidad desconocida y la desfosforilación de proteínas endógenas en ZF de rata por acción de ACTH (Paz y col., 1999). Dado que una de las proteínas que se desfosforila en residuos de tirosina por acción de ACTH es la paxilina, tanto en células adrenocorticales de la línea Y1 (Han y Rubin, 1996) y bovinas (Rocchi y col., 2000) como en ZF de adrenal de rata (Paz y col., 1999), postular que las fosfatasas PTP-PEST y/o PTP1D median el efecto de ACTH sobre el contenido de fosfotirosina –entre ellas la paxilina- resultaba lógico.

El peso molecular correspondiente a la proteína PTP-PEST de origen humano es de 88 kDa. Similarmente, la PTP-PEST de origen murino exhibe 86 kDa de peso molecular. Sin embargo, el análisis por SDS-PAGE (Western blot o geles de actividad) de PTP-PEST de diferentes orígenes revela una proteína 120-125 kDa (Horsch y col., 2001; Markova y col., 2003). Estos antecedentes sugerían que la tirosina fosfatasa de 115 kDa de ZF de adrenal de rata podría ser PTP-PEST. Esta hipótesis fue analizada utilizando un anticuerpo dirigido contra un péptido de la proteína PTP-PEST de origen humano que se recomienda para la detección de PTP-PEST de diversos orígenes, entre ellos de rata. Con este anticuerpo anti PTP-PEST se detectó por Western blot una banda específica tanto en la fracción citosólica de ZF como en las muestras de PTP115 en proceso de purificación, resultado que contribuye a comprobar la

hipótesis planteada en cuanto a la identidad de la tirosina fosfatasa de 115 kDa de ZF.

Dado que PTP-PEST es una proteína de expresión ubicua, la actividad de fosfatasa de 115 kDa podría ser atribuida a la presencia de PTP-PEST en otros tipos celulares presentes en la preparación de la muestra de ZF. Esta posibilidad queda descartada por el hecho de que la actividad de fosfatasa de 115 kDa responde a la activación con ACTH, indicando que corresponde a una enzima de célula adrenocortical. Sin embargo no se excluye la posibilidad de que PTP-PEST se exprese en varios tipos celulares de la glándula adrenal.

El análisis en geles de actividad de tirosina fosfatasa de los lisados de células adrenocorticales de la línea Y1, revela una banda de actividad correspondiente a una proteína de 115 kDa aproximadamente, al igual que en células MA-10 (Maciel y col., 2001) y en ZF de adrenal de rata. Estos conocimientos, sumados a que se detectó el ARNm correspondiente a PTP-PEST en células adrenocorticales Y1 y de Leydig MA-10, permiten inferir que la señal correspondiente a PTP-PEST detectada en ZF por Western blot corresponde a la expresión de esta proteína en células adrenocorticales.

Con el fin de disponer una muestra de PTP115 apropiada para su empleo en ensayos de cinética enzimática, se implementó un protocolo de purificación. Con el esquema de purificación ensayado, la tirosina fosfatasa de 115 kDa fue altamente purificada, al menos en lo que respecta a otras tirosina fosfatasas de menor peso molecular, según el análisis en geles de actividad. Se estima que el grado de purificación alcanzado con el protocolo establecido supera las 6000 veces. La etapa de filtrado permitió obtener una muestra que conserva la actividad de fosfatasa correspondiente a PTP115, y que no contiene cantidades detectables de proteínas según reveló el análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie e incluso con nitrato de plata. Esto sugiere que la etapa de filtración incrementa, en gran medida, el grado de purificación de la muestra. Debe tenerse en cuenta que el análisis en geles de actividad no permite detectar tirosina fosfatasas de peso molecular mayor a 130 kDa (Burrige y Nelson, 1995). Las tirosina fosfatasas con ese peso molecular suelen ser por lo general enzimas transmembrana (PTPs de tipo receptor). Por lo tanto, era poco probable detectar en la fracción citosólica de ZF de adrenal de rata, preparación a partir de la cual se realizó la purificación, tirosina

fosfatasa de peso molecular mayor a 130 kDa. En contraste, en la ZF de adrenal se detectan varias tirosina fosfatasa de peso molecular menor a 120 kDa, pero estas enzimas fueron excluidas de la muestra durante el proceso de purificación. Por lo tanto, se estima que la muestra semipurificada conteniendo PTP-PEST no contiene cantidades mayormente importantes de otras tirosina fosfatasa. Aunque la muestra semipurificada pudiera contener otras proteínas, la presencia de proteínas sin actividad de fosfatasa no interferiría en los estudios tendientes a caracterizar la actividad de la enzima de 115 kDa que identificamos como PTP-PEST.

La muestra semipurificada conteniendo PTP115 –identificada como PTP-PEST- se empleó para estudiar los efectos de la fosforilación *in vitro* sobre los parámetros cinéticos de la enzima. Los ensayos de actividad de fosfatasa en solución, mostraron que cuando la muestra semipurificada se somete a un ensayo de fosforilación *in vitro* con PKA los parámetros cinéticos de la enzima se modifican respecto de los que exhibe la muestra incubada sin PKA: aumenta la velocidad máxima y aumenta el Km aparente. Garton y Tonks analizaron la fosforilación de una muestra de PTP-PEST recombinante purificada y demostraron que PKA y PKC catalizan la fosforilación de esta proteína en los sitios Ser 39 y Ser 435 (Garton y Tonks, 1994). Estos autores demostraron que la fosforilación disminuye la actividad enzimática al aumentar el Km aparente de la enzima frente al sustrato RCM-Lisozima. Aunque en este trabajo de Tesis se utilizó un sustrato diferente (pGT), los resultados obtenidos son coincidentes en lo que respecta al Km, afianzando una vez más la noción que la PTP de 115 kDa de ZF es PTP-PEST. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el Km es un parámetro cinético que depende de la naturaleza química del sustrato. En este sentido, la actividad evaluada frente al sustrato fisiológico daría una idea más acertada acerca del efecto de la fosforilación mediada por PKA sobre la afinidad de la enzima por su sustrato proteico *in vivo*. En este trabajo se demuestra, además, que cuando la tirosina fosfatasa de 115 kDa se somete al ensayo de fosforilación con PKA se incrementa la velocidad máxima, mientras que los trabajos de Garton y Tonks no demuestran un incremento notable en este parámetro. Estas discrepancias podrían atribuirse al hecho de que la proteína recombinante y la utilizada en este trabajo podrían diferir en el grado de

fosforilación basal. El incremento en la velocidad máxima por fosforilación, sugiere que la incorporación de grupos fosfato en la proteína produciría un cambio conformacional que lleva a una mayor actividad enzimática. Se deduce que la fosforilación de PTP-PEST aumentaría la actividad frente a aquellos sustratos presentes en concentraciones mayores al  $K_m$  para ese sustrato particular. En contraste, frente a concentraciones de sustrato muy por debajo del  $K_m$ , la fosforilación modificaría la afinidad de la enzima por el sustrato. El cambio de afinidad por fosforilación en la Ser 39 de PTP-PEST se atribuye al hecho de que este sitio se localiza muy próximo al sitio de unión al sustrato, y por lo tanto puede interferir en la unión del sustrato a la enzima (Garton y Tonks, 1994).

PTP-PEST es una fosfatasa que posee en el extremo C terminal una secuencia rica en prolina que interviene en la interacción con diferentes sustratos/moléculas adaptadoras. Se han identificado numerosos sustratos de PTP-PEST entre ellos p130<sup>cas</sup>, PSTPIP, Pyk2, Tyk2 y paxilina (Tiganis y Bennett, 2007). Todos estos sustratos señalan un papel de PTP-PEST en la reorganización del citoesqueleto, relacionados con procesos tales como migración y división celular (Angers-Loustau y col., 1999). Es interesante señalar que varios de los sustratos de PTP-PEST, además de paxilina, se expresan en células esteroideogénicas, entre ellos Tyk2 y p130<sup>cas</sup> (datos no mostrados). Por lo tanto, el cambio morfológico producido en las células adrenocorticales por estimulación con ACTH podría deberse a la activación de PTP-PEST y la consecuente desfosforilación de uno o más de los sustratos mencionados. Más aún, el cambio morfológico inducido por ACTH/PTP-PEST, podría facilitar el acceso de las gotas lipídicas conteniendo colesterol a las cercanías de las mitocondrias para la síntesis de esteroides. Proponer este modelo para la acción de una tirosina fosfatasa regulada por ACTH parece atractivo, aunque el papel del citoesqueleto en la estimulación hormonal de la esteroidogénesis no está totalmente definido (Stocco y Clark, 1996).

PTP1D, también llamada SHP-2, PTP2C, o Syp es una proteína citosólica de expresión ubicua, de 72 kDa de peso molecular, que contiene el dominio catalítico hacia el extremo carboxilo y en el extremo N-terminal dos dominios SH2 (Tiganis y Bennett, 2007). La presencia de dominios SH2 le confiere a esta proteína la capacidad de interactuar con proteínas fosforiladas en tirosina.

Otra característica de PTP1D es que presenta sitios consenso de fosforilación para distintas quinasas. Existen numerosos ejemplos sobre la regulación de PTP1D por fosforilación en tirosina frente al estímulo con factores de crecimiento, incluyendo al PDGF y EGF (Wu y col., 2006; D'Alessio y col., 2007). En general, la fosforilación de PTP1D en los residuos de tirosina, promueve la interacción de ésta con proteínas que contienen sitios SH2 (Herrera Abreu y col., 2006). PTP1D presenta además numerosos sitios consenso para la fosforilación en serina/treonina por distintas quinasas, aunque la fosforilación *in vivo* en estos residuos ha sido menos documentada comparada con la fosforilación en residuos de tirosina. En células PC12 se ha comprobado que la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de PTP1D por ERK2 en residuos de treonina provoca la inhibición de la actividad enzimática (Peraldi y col., 1994). La fosforilación en residuos de serina ha sido aún menos descripta. Rocchi y col. describieron que en células adrenocorticales bovinas, PTP1D se fosforila *in vivo* en un residuo de serina frente al estímulo con ACTH o *in vitro* por acción de PKA (Rocchi y col., 2000). En ambos casos se demostró que la fosforilación incrementa la actividad enzimática (Rocchi y col., 2000).

A partir de los datos que surgen de este trabajo de Tesis, se concluye que la tirosina fosfatasa de 80 kDa que se activa por ACTH/AMPC en ZF de adrenal de rata (Paz y col., 1999) es PTP1D. El hecho de comprobar en los experimentos descriptos aquí, que PTP1D exhibe una movilidad electroforética correspondiente a una proteína de 80 kDa, fue fundamental para plantear que la fosfatasa de tirosina de 80 kDa que se activa por ACTH en ZF era PTP1D. Se demuestra además que esta proteína se expresa en células adrenocorticales de la línea Y1 y de Leydig de la línea MA-10. Cabe destacar que, en células de Leydig MA-10, la estimulación con 8Br-AMPC promueve la activación de una tirosina fosfatasa de 80 kDa (Maciel y col., 2001).

Los estudios de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-PTP1D y posterior análisis de los inmunoprecipitados en geles de actividad, demuestran que el tratamiento *in vivo* con ACTH incrementa en gran medida la actividad de la enzima presente en ZF de adrenal. Por otra parte a partir de los estudios de fosforilación *in vitro* con PKA, se concluye que la fosforilación conduce a un incremento en la actividad de la proteína. El análisis conjunto de los datos

presentados, indica que ACTH promueve la fosforilación y activación dependiente de PKA de PTP1D en ZF de adrenal de rata, en coincidencia con los resultados que describen la activación de PTP1D en células adrenocorticales bovinas (Rocchi y col., 2000). Estos resultados, sumados al hecho de que en células de Leydig el AMPc promueve la activación una tirosina fosfatasa con movilidad electroforética igual a PTP1D, sugieren que la activación hormonal de PTP1D es una característica común de las células adrenocorticales y de Leydig.

Varios trabajos describen que la actividad de PTP1D se vincula con la reorganización del citoesqueleto a través de la desfosforilación de la paxilina (Vadlamudi y col., 2002; Fernstrom y col., 2005). Sin embargo también se atribuyen a PTP1D una función a nivel de la transcripción génica, como regulador de la actividad de factores de transcripción que se fosforilan en residuos de tirosina (Liu y col., 2007). La activación de factores de transcripción por fosforilación en tirosina está ampliamente caracterizada (Shuai y col., 1992; Silva, 2004). En contraste, no existen muchos trabajos que describan la activación de la transcripción por la acción de fosfatasas de tirosina (Servidei y col., 1998). En lo referente a PTP1D, Servidei y col. describieron que esta enzima tiene un efecto dual (positivo y negativo) sobre la regulación de la transcripción de genes inducidos por CNTF (factor neurotrófico ciliar) y dependientes de los factores de transcripción STAT y AP-1, en una línea celular de neuroblastoma (Servidei y col., 1998). Estos autores demostraron que la sobreexpresión de una mutante de PTP1D catalíticamente inactiva bloquea la expresión de c-fos y consecuentemente, disminuyen la actividad de AP-1 y la expresión de genes regulados por CNTF y dependientes de AP-1. En contraste, estos autores demostraron que la sobreexpresión de la mutante promueve la activación de STAT promoviendo un incremento en la fosforilación en tirosina del mismo.

En el contexto de lo descrito en el párrafo anterior, resulta importante mencionar que nuestro grupo ha demostrado –mediante el empleo de inhibidores de tirosina fosfatasas permeables– que la actividad de tirosina fosfatasa participa en la regulación hormonal de la esteroidogénesis (Paz y col., 1999; Maciel y col., 2001). Más aún, se demostró que la acción de estas enzimas está ubicada luego de la acción de PKA y previo al acceso de

colesterol a la membrana mitocondrial interna de células adrenales y de Leydig (Paz y col., 1999; Maciel y col., 2001). Estudios posteriores indicaron que los inhibidores de tirosina fosfatasa impiden la expresión del gen de StAR inducida por AMPc en células de Leydig (Paz y col., 2002). En síntesis, estos estudios sugieren la participación de una tirosina fosfatasa para activar un factor de transcripción, o incluso inhibir la actividad de un factor inhibitorio (como DAX-1), y por ende para promover –directa o indirectamente- la transcripción de StAR. Al respecto, se demostró recientemente en nuestro laboratorio, que la inhibición de la actividad de tirosina fosfatasa en células adrenocorticales y de Leydig, suprime el efecto hormonal sobre los niveles de las proteínas ACS4 y StAR (Cornejo Maciel y col., 2005; Cano y col., 2006). También se demostró, que el agregado de AA, revierte el efecto de los inhibidores de PTPs sobre la inducción de la proteína StAR. Se propuso que la secuencia de eventos disparados por hormona/AMPc incluye la activación mediada por PKA de tirosina fosfatasa, la acción de estas enzimas en la inducción de ACS4, la liberación de AA mediada por el sistema ACS4/Acot2 y la acción del AA (o sus metabolitos) sobre la inducción de la proteína StAR (Cornejo Maciel y col., 2005; Cano y col., 2006). Los resultados de este trabajo permiten plantear un modelo, donde la activación dependiente de PKA de PTP1D promueve la inducción –probablemente mediante la modulación de un factor de transcripción- de ACS4. El incremento en los niveles de ACS4 y en la actividad de Acot2 por acción hormonal, conducirían a la liberación de AA, el cual mediaría la inducción de StAR.

El cambio de actividad de una proteína por fosfo-desfosforilación es un evento rápido. En particular la activación de tirosina fosfatasa por ACTH en ZF fue detectada a los pocos minutos de estimulación (Paz y col., 1999). Incluso la activación de PTP1D, en células adrenocorticales bovinas es detectada luego de unos minutos de estimulación con ACTH. En base a estos conocimientos es que se propone que la activación –en lugar de la inducción- de una tirosina fosfatasa es necesaria para la inducción hormonal de StAR. En este contexto, la fosforilación y activación de PTP-PEST y PTP1D participaría en la regulación aguda de la esteroidogénesis por su acción sobre el citoesqueleto y/o sobre la expresión de StAR. Si bien los resultados presentados en este trabajo no permiten descartar una acción de ACTH/AMPc sobre los niveles de

expresión de PTP-PEST y PTP1D, mediante Western blot no se detectaron cambios en la cantidad de PTP1D presente en células Y1 luego de 8 horas de estimulación (datos no mostrados).

Otro aspecto abordado en este trabajo es el relacionado con la regulación de la expresión de tirosina fosfatasa. Particularmente el estudio se focalizó en una fosfatasa de actividad dual específicamente involucrada en la desfosforilación de miembros de la familia de las MAPKs e inducible por un amplio y variado grupo de estímulos: MKP-1. El interés en esta enzima en particular se fundamentó en varios antecedentes. Primeramente, se conocía que las hormonas ACTH y LH promueven la activación de MAPKs (Watanabe y col., 1997; Le y Schimmer, 2001; Hirakawa y Ascoli, 2003), sin embargo los antecedentes sobre las fosfatasas que participan en la inactivación de estas quinasas eran limitados. Por lo tanto, sabiendo que MKP-1 reconoce un amplio espectro de MAPKs como sustrato (Kelly y Chu, 2000), se puede postular a MKP-1 como componente del mecanismo de regulación de las MAPKs en células esteroideogénicas. En segundo lugar, los antecedentes que demuestran que la activación hormonal de ERK1/2 en células esteroideogénicas participa en la modulación de la actividad de un factor de transcripción como SF-1 (Gyles y col., 2001), sugieren que una MKP nuclear como MKP-1 puede impactar sobre la actividad de SF-1 y ser regulada hormonalmente en células productoras de esteroides.

Los estudios sobre MKP-1 se realizaron empleando como modelo experimental las células adrenocorticales de la línea Y1 y las células de Leydig MA-10. Se demostró que en ambos tipos celulares los niveles del ARNm correspondiente se incrementan en forma rápida y transitoria por un mecanismo dependiente de AMPc (Bey, Gorostizaga y col., 2003).

En distintos tipos celulares se ha observado la regulación transcripcional de MKP-1 por acción de múltiples señales. Se ha demostrado la inducción de la misma por estímulos tales como EGF (Ryser y col., 2002), ácido araquidónico (Metzler y col., 1998), estrés cíclico (Li y col., 1999), glucagon (Schliess y col., 2000), 2000) y hormona liberadora de tirotrófina (Ryser y col., 2002). Los experimentos realizados en este trabajo en células MA-10 utilizando un inhibidor de la transcripción, tal como la Act D, revelan que el incremento en los niveles de mensajero de MKP-1 se debe a una acción del AMPc a nivel



transcripcional, y no a una acumulación por estabilización del mensajero preexistente. En este aspecto, estos resultados son coincidentes con los que describimos previamente en células adrenocorticales de la línea Y1 (Gorostizaga, Bey y col., 2003). Los conocimientos alcanzados en cuanto a la regulación por AMPc de MKP-1 en células adrenocorticales Y1 y en células de Leydig MA-10, junto con los de Sewer y Waterman, que demuestran la inducción de MKP-1 por ACTH/AMPc en células adrenocorticales humanas H295R (Sewer y Waterman, 2003), sugieren que la inducción de MKP-1 por acción de la hormona trófica correspondiente es un evento común en células esteroideogénicas.

Los estudios aquí descritos revelan que la cinética de inducción de MKP-1 por AMPc, es transitoria en ambos tipos celulares estudiados. El hecho de que en células Y1 y MA-10 el AMPc provoque la inducción de MKP-1, sugiere que el efecto hormonal sobre la transcripción del gen involucra, al menos parcialmente, la actividad de PKA. Estos datos concuerdan con trabajos previos que demuestran la inducción de MKP-1 por agentes que elevan el AMPc en células PC12 (Burgun y col., 2000). Más aún, el análisis de la región cercana al 5' de las secuencias de los genes de MKP-1 murino y humano, revela dos elementos respondedores a  $Ca^{2+}$ /AMPc en la región promotora (Sommer y col., 2000), lo cual sustenta el papel de PKA en la expresión de MKP-1 inducida hormonalmente en células esteroideogénicas.

La estabilidad de los ARNm de los genes de expresión temprana dependen de la síntesis de proteínas (Lau y Nathans, 1987). Aquí se demuestra que un inhibidor de la síntesis proteica incrementa *per se* los niveles del ARNm de MKP-1. Esta observación sugiere que una proteína lábil impide la acumulación del ARNm de MKP-1, posiblemente disminuyendo la estabilidad del mismo. Al respecto hay que mencionar que los ARNm correspondientes a genes de expresión temprana son lábiles, y que el gen de MKP-1 está clasificado como de expresión temprana.

Teniendo en cuenta el amplio espectro de estímulos que inducen a MKP-1, resulta lógico pensar que existen múltiples señales involucradas en la regulación de la transcripción del gen de MKP-1. De hecho, se ha descrito que en varios sistemas los mismos estímulos que promueven la activación de las MAPKs inducen MKP-1 (Kelly y Chu 2000). Más aún, varios estudios

establecen un rol para las MAPKs como componentes de las cascadas que conducen a la inducción de MKP-1 (Cook y col., 1997; Schliess y col., 2000). Ante estos conocimientos, la pregunta que surge es si la actividad de ERK1/2 está involucrada en la inducción de MKP-1 por AMPc en células esteroidogénicas. En células de Leydig MA-10 el AMPc conduce a la activación de ERK1/2 (Hirakawa y Ascoli, 2003) con una cinética (Poderoso y col., 2008) que es compatible con su participación en la inducción de MKP-1. Al demostrar que el bloqueo de la activación de ERK1/2 no impide el incremento de los niveles del ARNm de MKP-1 inducido por AMPc, se concluye que en células de Leydig de la línea MA-10 la inducción de MKP-1 disparada por AMPc es independiente de la activación de ERK1/2. Estos resultados difieren de lo observado en otros sistemas como por ejemplo la inducción de MKP-1 por glucagon en hepatocitos (Schliess y col., 2000).

En este estudio, se ha analizado la regulación de MKP-1 a nivel transcripcional. Si bien aquí se demuestra la regulación transcripcional de MKP-1 por acción hormonal, no se descarta una regulación a través de modificaciones post-traduccionales de la proteína. Esta hipótesis se fundamenta en datos recientes de nuestro grupo, que sugieren que en células de Leydig el AMPc promueve la fosforilación y estabilización de la proteína (datos no mostrados). Por otro lado, los antecedentes que indican que la expresión de MKP-1 es regulada por hormonas esteroidogénicas sugieren que esta proteína podría tener una función relevante en la biología de las células productoras de esteroides. En relación a este tema, merecen mencionarse los trabajos de Sewer y Waterman, quienes demostraron que la actividad de serina/treonina y tirosina fosfatasa es necesaria para la transcripción del gen CYP17, el cual codifica para una hidroxilasa de la biosíntesis de esteroides. Estos autores postularon por primera vez que una fosfatasa dual es necesaria para este proceso (Sewer y Waterman, 2002). Posteriormente, los mismos autores demostraron que la fosfatasa dual que participa en la expresión de CYP17 es MKP-1. La transcripción del gen CYP17 requiere la actividad de SF-1, un factor de transcripción que como ya se mencionó también participa en la expresión del gen de StAR (Reinhart y col., 1999). Sewer y Waterman demostraron que la actividad de MKP-1 se necesita para promover –directa o indirectamente por su acción a nivel de ERK1/2- la desfosforilación y actividad

transcripcional de SF-1 sobre el CYP17 (Sewer y Waterman, 2003). Estos resultados, sumados al hecho de que la expresión de CYP17 ocurre en todos los tipos de células esteroidogénicas y está bajo control hormonal, indican que los niveles de MKP-1 deben estar finamente regulados por las hormonas tróficas correspondientes en todos los tipos de células esteroidogénicas. Al respecto, los conocimientos que surgen de las investigaciones realizadas en células adrenocorticales y de Leydig aquí descritos, como también los que surgen de experimentos recientes de nuestro grupo, avalan esta hipótesis.

La expresión del gen de StAR es otro proceso que involucra la participación de SF-1. En células adrenocorticales de la línea Y1 y de Leydig de la línea MA-10, la activación hormonal de ERK1/2 promueve la fosforilación de SF-1 y su actividad transcripcional frente al gen de StAR (Gyles y col., 2001). En este mecanismo, la expresión de MKP-1 inducida hormonalmente podría ejercer un control negativo sobre la expresión de StAR por su acción sobre la actividad de ERK1/2, revelando efectos opuestos de MKP-1 en las expresiones de CYP17 y StAR. Sin embargo, es poco probable que MKP-1 interfiera en la expresión del gen de StAR, ya que la activación de ERK1/2, la fosforilación de SF-1 y su unión al promotor de StAR, preceden al incremento de los niveles de la proteína MKP-1. Más bien es posible que la fosforilación y desfosforilación coordinada de SF-1 conduzcan a la activación temporal de conjuntos de genes regulados por SF-1. De hecho se ha propuesto un modelo cinético para la activación transcripcional de SF-1 que involucra un circuito de fosfo/desfosforilación mediado por MAPKs y MKP-1 (Winnay y Hammer, 2006). En este modelo, resulta evidente que un control espacio-temporal estricto sobre las MKPs contribuye a la regulación de la actividad de MAPKs. En particular, la regulación de la expresión de una MKPs nuclear como MKP-1 en células esteroidogénicas, por las hormonas tróficas correspondientes, sería relevante como evento regulatorio de la transcripción de genes específicos de este tipo de células.

Trabajos recientes de nuestro grupo de investigación demostraron por primera vez la localización de ERK1/2 en mitocondrias de células de Leydig de la línea MA-10 y la activación transitoria de estas quinasas por acción hormonal (Poderoso y col., 2008). Más aún, se demostró que la actividad de ERK1/2 mitocondrial es necesaria para la fosforilación y activación de StAR

(Poderoso y col., 2008). En base a los antecedentes descritos y al hecho de que se ha detectado MKP-1 en mitocondrias de otro tipo de células (Rosini y col., 2004), se podría postular un papel de MKP-1 en mitocondrias para regular la actividad de ERK1/2 y StAR. Incluso puede postularse que la compartimentalización de MKP-1 es otro mecanismo para asegurar un control estricto de aquellos eventos dependientes de MAPKs y MKPs.

Otro objetivo planteado con respecto a la expresión de fosfatasa, estaba dirigido a analizar los efectos de un tipo de estrés sobre los niveles de expresión de MKP-1. Varios trabajos describen la inducción transcripcional del gen de MKP-1 mediada por múltiples agentes estresantes. El calor es una condición de estrés que afecta la esteroidogénesis en ciertos tipos celulares (Khanna y col., 1994; Liu y Stocco, 1997). Las células de Leydig son particularmente sensibles al aumento de temperatura, condición de estrés que interfiere con la acción hormonal sobre la esteroidogénesis como consecuencia de una acción a nivel de la expresión de la proteína StAR (Liu y Stocco, 1997) y del correspondiente ARNm (Murphy y col., 2001). Por lo tanto, una expresión inducida por calor cuantitativamente diferente de MKP-1 en dos tipos de células esteroidogénicas, podría estar vinculada con el grado de inhibición de la esteroidogénesis que produce este tipo de estrés, hipótesis que se analizó como parte de este trabajo de Tesis.

En este trabajo se examinaron puntualmente los efectos del estrés por calor vinculados con los procesos de fosfo/desfosforilación de las MAPKs en dos sistemas esteroidogénicos con distinta sensibilidad a este agente estresante: células adrenocorticales Y1 y de Leydig MA-10. Se concluye que el estrés por calor conduce a la activación de las mismas MAPKs en ambos tipos celulares (ERK1/2 y JNK1/2) y con una cinética similar. Por otra parte, se comprueba que el estrés por calor también es capaz de incrementar la expresión de MKP-1 en ambos tipos celulares, con una cinética compatible con la inactivación de las MAPKs, sugiriendo que MKP-1 participa en la desfosforilación de ERK1/2 y JNK1/2 en ambos sistemas empleados en el estudio. Además, estos hallazgos no revelan diferencias significativas entre ambos tipos celulares en lo que respecta a los procesos de fosfo/desfosforilación de MAPKs y expresión de MKP-1 que justifiquen la mayor sensibilidad de la esteroidogénesis testicular al estrés por calor. No obstante,

otros eventos relacionados con las MAPKs y MKPs podrían ser responsables de tales diferencias.

Otro evento integrante de la cascada de señalización disparada por el calor en diferentes tipos celulares, es la inducción de proteínas HSPs, entre ellas HSP72 (Morimoto y col., 1997). En nuestros sistemas observamos que la inducción de esta proteína ocurre en células de Leydig y adrenocorticales en el mismo marco temporal, aunque con diferente magnitud. Mientras que las células de Leydig exhiben bajos niveles de HSP72, que se incrementan varias veces por el golpe de calor, las células Y1 exhiben altos niveles basales de HSP72 que se incrementan ligeramente por efecto del calor. En un trabajo donde se analizan los efectos del calor sobre la esteroidogénesis, los autores comentan (datos no publicados) que el estrés por calor aumenta los niveles de HSP72 en células MA-10 pero no en células Y1 (Murphy y col., 2001). En síntesis, aparentemente, existen diferencias en lo que respecta al nivel de expresión de HSP72 en condiciones basales y bajo el estímulo por calor en células de Leydig y adrenocorticales. Sin embargo, si la expresión diferencial de la HSP72 en los dos tipos celulares está relacionada con la mayor o menor sensibilidad al calor, queda sin resolver.

Dado que la inducción de la HSP72 ocurre luego de la activación de las MAPKs y de la inducción de MKP-1, es factible -en el aspecto temporal- plantear una posible relación entre la inducción de HSP72 y esos dos procesos moleculares. Es bien conocido que en células de mamífero la expresión de HSPs involucra la actividad de HSF-1 (**Heat Shock Factor-1**), un factor de transcripción cuya actividad está modulada por fosforilación dependiente de MAPKs (Chu y col., 1996). Mientras que la fosforilación de HSF-1 gatillada por calor lleva a su activación, la fosforilación múltiple (*hiper-fosforilación*) inhibe su actividad transcripcional promoviendo su dispersión de los focos transcripcionales en el núcleo durante la recuperación del *golpe de calor* (Chu y col., 1996; Dai y col., 2000; Wang y col., 2004). Las MKPs, por su acción sobre las MAPKs, evitarían la fosforilación múltiple de HS-1, prolongando su acción en el núcleo. Basados en esta hipótesis, una expresión diferencial de MKP-1 en dos tipos celulares diferentes podría reflejarse en los niveles de expresión de HSP72. Para demostrar esta hipótesis sería importante encarar

un estudio comparativo de los niveles de la proteína MKP-1 y de su actividad en los dos tipos celulares luego del golpe de calor.

Los estudios realizados en el marco de este trabajo, demuestran una regulación transcripcional de MKP-1 en células esteroideogénicas por dos estímulos diferentes: uno de tipo fisiológico (ACTH/AMPC) y otro que produce injuria celular (*golpe de calor*). La caracterización del mecanismo de inducción revela mecanismos similares, no obstante se detectó una diferencia en lo que respecta a la participación de ERK1/2 en la inducción de MKP-1. En efecto, en células de Leydig de la línea MA-10 estimuladas con AMPC la inducción de MKP-1 es independiente de la actividad de ERK1/2. En contraste, en células sometidas a estrés por calor la inducción de MKP-1 depende de la activación de las ERK1/2. Esto indicaría que los niveles de MKP-1, en células MA-10, pueden ser regulados de manera dependiente o independiente de la activación de ERK1/2, dependiendo del estímulo que provoca la inducción.

En síntesis, las investigaciones realizadas en el marco de este trabajo de Tesis, demuestran la potencialidad de las hormonas esteroideogénicas como moduladoras tanto de la actividad de tirosina fosfatasas como del nivel de expresión de las mismas. Con respecto a la activación rápida de tirosina fosfatasas, se han identificado dos de las enzimas citosólicas activadas por ACTH/PKA en ZF de adrenal de rata: PTP1D y PTP-PEST, de 80 y 115 kDa respectivamente. Ambas enzimas son fosforiladas *in vitro* y activadas por PKA, lo que sugiere que la activación hormonal observada *in vivo* es desencadenada por eventos de fosforilación a través de PKA. En cuanto a la inducción de tirosina fosfatasas en células esteroideogénicas, en este trabajo se demuestra claramente la inducción dependiente de AMPC de una fosfatasa dual como MKP-1 en células adrenocorticales y de Leydig. La identificación de las tirosina fosfatasas activadas y/o reguladas por acción hormonal en células productoras de esteroides, es un hallazgo relevante porque proporciona las bases para caracterizar completamente los eventos de desfosforilación en tirosina, que forman parte del mecanismo de acción de ACTH/LH. Al respecto, los antecedentes bibliográficos en relación a la función de PTP-PEST y PTP1D en diferentes tipos celulares y las observaciones de nuestro grupo de trabajo, sustentan un modelo donde la activación de estas fosfatasas de tirosina llevan a un reordenamiento del citoesqueleto y/o la transcripción de genes

específicos que favorece el acceso de colesterol a la mitocondria. Otro componente del modelo, sería la inducción de MKP-1 por AMPc. MKP-1 podría regular los eventos celulares dependientes de las MAPKs en los distintos compartimentos de las células esteroideogénicas. Estudios futuros permitirán identificar los sustratos de estas tirosinas fosfatasas para determinar el rol de cada tirosina fosfatasa inducida y/o activada hormonalmente en la biología de las células esteroideogénicas.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



- Aaronson, SA (1991). "Growth factors and cancer." *Science* 254(5035): 1146-53.
- Abraham, E (2005). "Alterations in cell signaling in sepsis." *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7: S459-64.
- Almahbobi, G, Hall, PF (1990). "The role of intermediate filaments in adrenal steroidogenesis." *J Cell Sci* 97 ( Pt 4): 679-87.
- Almahbobi, G, Williams, LJ, Han, XG, Hall, PF (1993). "Binding of lipid droplets and mitochondria to intermediate filaments in rat Leydig cells." *J Reprod Fertil* 98(1): 209-17.
- Alonso, A, Sasin, J, Bottini, N, Friedberg, I, Friedberg, I, Osterman, A, Godzik, A, Hunter, T, Dixon, J, Mustelin, T (2004). "Protein tyrosine phosphatases in the human genome." *Cell* 117(6): 699-711.
- Andersen, JN, Mortensen, OH, Peters, GH, Drake, PG, Iversen, LF, Olsen, OH, Jansen, PG, Andersen, HS, Tonks, NK, Moller, NP (2001). "Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains." *Mol Cell Biol* 21(21): 7117-36.
- Angers-Loustau, A, Cote, JF, Charest, A, Dowbenko, D, Spencer, S, Lasky, LA, Tremblay, ML (1999). "Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts." *J Cell Biol* 144(5): 1019-31.
- Anholt, RR, De Souza, EB, Oster-Granite, ML, Snyder, SH (1985). "Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats." *J Pharmacol Exp Ther* 233(2): 517-26.
- Ascoli, M (1981). "Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses." *Endocrinology* 108(1): 88-95.
- Ashwell, JD (2006). "The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system." *Nat Rev Immunol* 6(7): 532-40.
- Bandyopadhyay, D, Kusari, A, Kenner, KA, Liu, F, Chernoff, J, Gustafson, TA, Kusari, J (1997). "Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin." *J Biol Chem* 272(3): 1639-45.
- Barford, D (1995). "Protein phosphatases." *Curr Opin Struct Biol* 5(6): 728-34.
- Barford, D (1996). "Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases." *Trends Biochem Sci* 21(11): 407-12.
- Bentires-Alj, M, Neel, BG (2007). "Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer." *Cancer Res* 67(6): 2420-4.

- Berndt, N (1999). "Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number." *Front Biosci* 4: D22-42.
- Bilwes, AM, den Hertog, J, Hunter, T, Noel, JP (1996). "Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- $\alpha$  by dimerization." *Nature* 382(6591): 555-9.
- Bork, P, Margolis, B (1995). "A phosphotyrosine interaction domain." *Cell* 80(5): 693-4.
- Boulton, TG, Cobb, MH (1991). "Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies." *Cell Regul* 2(5): 357-71.
- Bovolin, P, Schlichting, J, Miyata, M, Ferrarese, C, Guidotti, A, Alho, H (1990). "Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat." *Regul Pept* 29(2-3): 267-81.
- Bradford, MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brady, MJ, Saltiel, AR (2001). "The role of protein phosphatase-1 in insulin action." *Recent Prog Horm Res* 56: 157-73.
- Bridges, D, MacDonald, JA, Wadzinski, B, Moorhead, GB (2006). "Identification and characterization of D-AKAP1 as a major adipocyte PKA and PP1 binding protein." *Biochem Biophys Res Commun* 346(1): 351-7.
- Brondello, JM, Pouyssegur, J, McKenzie, FR (1999). "Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation." *Science* 286(5449): 2514-7.
- Brumell, JH, Chan, CK, Butler, J, Borregaard, N, Siminovitch, KA, Grinstein, S, Downey, GP (1997). "Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C." *J Biol Chem* 272(2): 875-82.
- Buonassisi, V, Sato, G, Cohen, AI (1962). "Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 1184-90.
- Burgun, C, Esteve, L, Humblot, N, Aunis, D, Zwiller, J (2000). "Cyclic AMP-elevating agents induce the expression of MAP kinase phosphatase-1 in PC12 cells." *FEBS Lett* 484(3): 189-93.
- Burrige, K, Nelson, A (1995). "An in-gel assay for protein tyrosine phosphatase activity: detection of widespread distribution in cells and tissues." *Anal Biochem* 232(1): 56-64.
- Camps, M, Chabert, C, Muda, M, Boschert, U, Gillieron, C, Arkininstall, S (1998). "Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12." *FEBS Lett* 425(2): 271-6.

- Cano, F, Poderoso, C, Cornejo Maciel, F, Castilla, R, Maloberti, P, Castillo, F, Neuman, I, Paz, C, Podesta, EJ (2006). "Protein tyrosine phosphatases regulate arachidonic acid release, StAR induction and steroidogenesis acting on a hormone-dependent arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase." *J Steroid Biochem Mol Biol* 99(4-5): 197-202.
- Carraway, KL, 3rd, Sliwkowski, MX, Akita, R, Platko, JV, Guy, PM, Nuijens, A, Diamonti, AJ, Vandlen, RL, Cantley, LC, Cerione, RA (1994). "The erbB3 gene product is a receptor for heregulin." *J Biol Chem* 269(19): 14303-6.
- Carsia, RV, Moyle, WR, Wolff, DJ, Malamed, S (1982). "Acute inhibition of corticosteroidogenesis by inhibitors of calmodulin action." *Endocrinology* 111(5): 1456-61.
- Castelli, M, Camps, M, Gillieron, C, Leroy, D, Arkinstall, S, Rommel, C, Nichols, A (2004). "MAP kinase phosphatase 3 (MKP3) interacts with and is phosphorylated by protein kinase CK2alpha." *J Biol Chem* 279(43): 44731-9.
- Castillo, AF, Maciel, FC, Castilla, R, Duarte, A, Maloberti, P, Paz, C, Podesta, EJ (2006). "cAMP increases mitochondrial cholesterol transport through the induction of arachidonic acid release inside this organelle in Leydig cells." *Febs J* 273(22): 5011-21.
- Ceulemans, H, Bollen, M (2004). "Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button." *Physiol Rev* 84(1): 1-39.
- Clark, AR (2003). "MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids?" *J Endocrinol* 178(1): 5-12.
- Clark, BJ, Soo, SC, Caron, KM, Ikeda, Y, Parker, KL, Stocco, DM (1995). "Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein." *Mol Endocrinol* 9(10): 1346-55.
- Clark, BJ, Wells, J, King, SR, Stocco, DM (1994). "The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)." *J Biol Chem* 269(45): 28314-22.
- Cohen, PT (2002). "Protein phosphatase 1--targeted in many directions." *J Cell Sci* 115(Pt 2): 241-56.
- Cook, SJ, Beltman, J, Cadwallader, KA, McMahon, M, McCormick, F (1997). "Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca<sup>2+</sup>-dependent signal pathways in Rat-1 cells." *J Biol Chem* 272(20): 13309-19.
- Cooke, BA, Lindh, ML, Janszen, FH (1976). "Correlation of protein kinase activation and testosterone production after stimulation of Leydig cells with luteinizing hormone." *Biochem J* 160(3): 439-46.

Corbalan-Garcia, S, Gomez-Fernandez, JC (2006). "Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes." *Biochim Biophys Acta* 1761(7): 633-54.

Cornejo Maciel, F, Poderoso, C, Gorostizaga, A, Paz, C, Podesta, EJ (2001). "LH/chorionic gonadotropin signaling pathway involves protein tyrosine phosphatase activity downstream of protein kinase A activation: evidence of an obligatory step in steroid production by Leydig cells." *J Endocrinol* 170(2): 403-11.

Cornejo Maciel, F, Maloberti, P, Neuman, I, Cano, F, Castilla, R, Castillo, F, Paz, C, Podesta, EJ (2005). "An arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase is a hormone-dependent and obligatory protein in the signal transduction pathway of steroidogenic hormones." *J Mol Endocrinol* 34(3): 655-66.

Cortese, F, Wolf, J (1978). "Cytochalasin-stimulated steroidogenesis from high density lipoproteins." *J Cell Biol* 77(2): 507-16.

Crivello, JF, Jefcoate, CR (1978). "Mechanisms of corticotropin action in rat adrenal cells. I. The effects of inhibitors of protein synthesis and of microfilament formation on corticosterone synthesis." *Biochim Biophys Acta* 542(2): 315-29.

Crivello, JF, Jefcoate, CR (1980). "Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetics and effects of inhibitors." *J Biol Chem* 255(17): 8144-51.

Charbonneau, H, Tonks, NK (1992). "1002 protein phosphatases?" *Annu Rev Cell Biol* 8: 463-93.

Chen, J, Parsons, S, Brautigan, DL (1994). "Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts." *J Biol Chem* 269(11): 7957-62.

Chen, W, Possemato, R, Campbell, KT, Plattner, CA, Pallas, DC, Hahn, WC (2004). "Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation." *Cancer Cell* 5(2): 127-36.

Chomczynski, P, Sacchi, N (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.

Chu, B, Soncin, F, Price, BD, Stevenson, MA, Calderwood, SK (1996). "Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1." *J Biol Chem* 271(48): 30847-57.

D'Alessio, A, Cerchia, L, Amelio, I, Incoronato, M, Condorelli, G, de Franciscis, V (2007). "Shp2 in PC12 cells: NGF versus EGF signalling." *Cell Signal* 19(6): 1193-200.

- Dai, R, Frejtag, W, He, B, Zhang, Y, Mivechi, NF (2000). "c-Jun NH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity." *J Biol Chem* 275(24): 18210-8.
- Davis RJ (2000). "Signaling transduction to the nucleus by MAP kinase", *Signaling networks and cell cycle control: the molecular basis of cancer and other diseases*; Gutkind JS, 1st ed., New Jersey: Humana Press; 153-164.
- Davis, WW, Garren, LD (1968). "On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. The inhibitory site of cycloheximide in the pathway of steroid biosynthesis." *J Biol Chem* 243(19): 5153-7.
- De Baere, I, Derua, R, Janssens, V, Van Hoof, C, Waelkens, E, Merlevede, W, Goris, J (1999). "Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue." *Biochemistry* 38(50): 16539-47.
- Dempsey, EC, Newton, AC, Mochly-Rosen, D, Fields, AP, Reyland, ME, Insel, PA, Messing, RO (2000). "Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(3): L429-38.
- Denu, JM, Lohse, DL, Vijayalakshmi, J, Saper, MA, Dixon, JE (1996). "Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2493-8.
- Dewi, DA, Abayasekara, DR, Wheeler-Jones, CP (2002). "Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific." *Endocrinology* 143(3): 877-88.
- Dickinson, RJ, Keyse, SM (2006). "Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases." *J Cell Sci* 119(Pt 22): 4607-15.
- Dietschy, JM, Turley, SD (2001). "Cholesterol metabolism in the brain." *Curr Opin Lipidol* 12(2): 105-12.
- Dufau, ML, Tsuruhara, T, Horner, KA, Podesta, E, Catt, KJ (1977). "Intermediate role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8): 3419-23.
- Eipper, BA, Mains, RE, Guenzi, D (1976). "High molecular weight forms of adrenocorticotrophic hormone are glycoproteins." *J Biol Chem* 251(13): 4121-6.
- Falke, HE, Degenhart, HJ, Abeln, GJ, Visser, HK (1975). "Studies on isolated rat adrenal cells metabolism of hydroxylated sterols." *Mol Cell Endocrinol* 3(5): 375-83.
- Farooq, A, Plotnikova, O, Chaturvedi, G, Yan, S, Zeng, L, Zhang, Q, Zhou, MM (2003). "Solution structure of the MAPK phosphatase PAC-1 catalytic domain. Insights into substrate-induced enzymatic activation of MKP." *Structure* 11(2): 155-64.

- Favre, B, Zolnierowicz, S, Turowski, P, Hemmings, BA (1994). "The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo." *J Biol Chem* 269(23): 16311-7.
- Fawcett, DW (1975). "Gametogenesis in the male: prospects for its control." *Symp Soc Dev Biol*(33): 25-53.
- Fernstrom, K, Farmer, P, Ali, MS (2005). "Cytoskeletal remodeling in vascular smooth muscle cells in response to angiotensin II-induced activation of the SHP-2 tyrosine phosphatase." *J Cell Physiol* 205(3): 402-13.
- Fischer, EH, Charbonneau, H, Tonks, NK (1991). "Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes." *Science* 253(5018): 401-6.
- Flint, AJ, Gebbink, MF, Franza, BR, Jr., Hill, DE, Tonks, NK (1993). "Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation." *Embo J* 12(5): 1937-46.
- Formisano, P, Beguinot, F (2001). "The role of protein kinase C isoforms in insulin action." *J Endocrinol Invest* 24(6): 460-7.
- Foster, RH (2004). "Reciprocal influences between the signalling pathways regulating proliferation and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells." *J Mol Endocrinol* 32(3): 893-902.
- Franklin, CC, Kraft, AS (1997). "Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells." *J Biol Chem* 272(27): 16917-23.
- Fraser, R, Brown, JJ, Lever, AF, Mason, PA, Robertson, JI (1979). "Control of aldosterone secretion." *Clin Sci (Lond)* 56(5): 389-99.
- Garton, AJ, Tonks, NK (1994). "PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation." *Embo J* 13(16): 3763-71.
- Granneman, JG, Moore, HP, Granneman, RL, Greenberg, AS, Obin, MS, Zhu, Z (2007). "Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes." *J Biol Chem* 282(8): 5726-35.
- Groom, LA, Sneddon, AA, Alessi, DR, Dowd, S, Keyse, SM (1996). "Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase." *Embo J* 15(14): 3621-32.
- Gupta, S, Barrett, T, Whitmarsh, AJ, Cavanagh, J, Sluss, HK, Derijard, B, Davis, RJ (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." *Embo J* 15(11): 2760-70.
- Gyles, SL, Burns, CJ, Whitehouse, BJ, Sugden, D, Marsh, PJ, Persaud, SJ, Jones, PM (2001). "ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis

through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene." *J Biol Chem* 276(37): 34888-95.

Hall, PF, Charpponnier, C, Nakamura, M, Gabbiani, G (1979). "The role of microfilaments in the response of adrenal tumor cells to adrenocorticotrophic hormone." *J Biol Chem* 254(18): 9080-4.

Han, JD, Rubin, CS (1996). "Regulation of cytoskeleton organization and paxillin dephosphorylation by cAMP. Studies on murine Y1 adrenal cells." *J Biol Chem* 271(46): 29211-5.

Hansson, V, Skalhegg, BS, Tasken, K (1999). "Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA." *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1-6): 367-78.

Heldin, CH (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." *Cell* 80(2): 213-23.

Herrera Abreu, MT, Wang, Q, Vachon, E, Suzuki, T, Chow, CW, Wang, Y, Hong, O, Villar, J, McCulloch, CA, Downey, GP (2006). "Tyrosine phosphatase SHP-2 regulates IL-1 signaling in fibroblasts through focal adhesions." *J Cell Physiol* 207(1): 132-43.

Hirakawa, T, Ascoli, M (2003). "The lutropin/choriogonadotropin receptor-induced phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases in leydig cells is mediated by a protein kinase a-dependent activation of ras." *Mol Endocrinol* 17(11): 2189-200.

Horsch, K, Schaller, MD, Hynes, NE (2001). "The protein tyrosine phosphatase-PEST is implicated in the negative regulation of epidermal growth factor on PRL signaling in mammary epithelial cells." *Mol Endocrinol* 15(12): 2182-96.

Howe, AK (2004). "Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA." *Biochim Biophys Acta* 1692(2-3): 159-74.

Huang, FL, Glinsmann, WH (1976). "Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle." *Eur J Biochem* 70(2): 419-26.

Huang, HB, Chen, YC, Lee, TT, Huang, YC, Liu, HT, Liu, CK, Tsay, HJ, Lin, TH (2007). "Structural and biochemical characterization of inhibitor-1alpha." *Proteins* 68(3): 779-88.

Ihle, JN, Witthuhn, BA, Quelle, FW, Yamamoto, K, Thierfelder, WE, Kreider, B, Silvennoinen, O (1994). "Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs." *Trends Biochem Sci* 19(5): 222-7.

Inagaki, K, Noguchi, T, Matozaki, T, Horikawa, T, Fukunaga, K, Tsuda, M, Ichihashi, M, Kasuga, M (2000). "Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant." *Oncogene* 19(1): 75-84.

- Ip, YT, Davis, RJ (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 205-19.
- Iyer, RB, Chauhan, A, Koritz, SB (1988). "The stimulation by adrenocorticotropin of the phosphorylation of adrenal inhibitor-1: a possible role in steroidogenesis." *Mol Cell Endocrinol* 60(1): 61-9.
- Jain, J, McCaffrey, PG, Miner, Z, Kerppola, TK, Lambert, JN, Verdine, GL, Curran, T, Rao, A (1993). "The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun." *Nature* 365(6444): 352-5.
- Jamieson, JS, Tumbarello, DA, Halle, M, Brown, MC, Tremblay, ML, Turner, CE (2005). "Paxillin is essential for PTP-PEST-dependent regulation of cell spreading and motility: a role for paxillin kinase linker." *J Cell Sci* 118(Pt 24): 5835-47.
- Janssens, V, Goris, J (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." *Biochem J* 353(Pt 3): 417-39.
- Jefcoate, CR, DiBartolomeis, MJ, Williams, CA, McNamara, BC (1987). "ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells." *J Steroid Biochem* 27(4-6): 721-9.
- Jideama, NM, Crawford, BH, Hussain, AK, Raynor, RL (2006). "Dephosphorylation specificities of protein phosphatase for cardiac troponin I, troponin T, and sites within troponin T." *Int J Biol Sci* 2(1): 1-9.
- Kang, MJ, Fujino, T, Sasano, H, Minekura, H, Yabuki, N, Nagura, H, Iijima, H, Yamamoto, TT (1997). "A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 2880-4.
- Karaboyas, GC, Koritz, SB (1965). "The Transformation of Delta-5-Pregnenolone and Progesterone to Cortisol by Rat Adrenal Slices and the Effect of Acth and Adenosine 3',5'-Monophosphate Upon It." *Biochim Biophys Acta* 100: 600-2.
- Kelly K, Chu Y (2000). "The regulation of MAP kinase pathways by MAP kinase phosphatases" *Signaling networks and cell cycle control: the molecular basis of cancer and other diseases*; Gutkind JS, 1st ed. New Jersey: Humana Press; 165-182.
- Khanna, A, Aten, RF, Behrman, HR (1994). "Heat shock protein induction blocks hormone-sensitive steroidogenesis in rat luteal cells." *Steroids* 59(1): 4-9.
- Kikkawa, U, Kishimoto, A, Nishizuka, Y (1989). "The protein kinase C family: heterogeneity and its implications." *Annu Rev Biochem* 58: 31-44.



- Kim, GS, Choi, YK, Song, SS, Kim, WK, Han, BH (2005). "MKP-1 contributes to oxidative stress-induced apoptosis via inactivation of ERK1/2 in SH-SY5Y cells." *Biochem Biophys Res Commun* 338(4): 1732-8.
- Klein, NA, Andersen, RN, Casson, PR, Buster, JE, Kramer, RE (1992). "Mechanisms of insulin inhibition of ACTH-stimulated steroid secretion by cultured bovine adrenocortical cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* 41(1): 11-20.
- Kolch, W (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.
- Kondoh, K, Nishida, E (2007). "Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases." *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1227-37.
- Koritz, SB, Kumar, AM (1970). "On the mechanism of action of the adrenocorticotrophic hormone. The stimulation of the activity of enzymes involved in pregnenolone synthesis." *J Biol Chem* 245(1): 152-9.
- Kotani, S, Murofushi, H, Sakai, H (1988). "Dual effect of antimitotic drugs on steroid secretion in mouse adrenocortical Y-1 tumor cells." *Cell Struct Funct* 13(2): 171-7.
- Krueger, RJ, Orme-Johnson, NR (1983). "Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein." *J Biol Chem* 258(16): 10159-67.
- Kyriakis, JM, Avruch, J (1996). "Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines." *Bioessays* 18(7): 567-77.
- Lacapere, JJ, Papadopoulos, V (2003). "Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis." *Steroids* 68(7-8): 569-85.
- Laemmli, UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lau, LF, Nathans, D (1987). "Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(5): 1182-6.
- Le, T, Schimmer, BP (2001). "The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells." *Endocrinology* 142(10): 4282-7.
- Lefkowitz, RJ (2007). "Seven transmembrane receptors: a brief personal retrospective." *Biochim Biophys Acta* 1768(4): 748-55.
- Li, C, Hu, Y, Mayr, M, Xu, Q (1999). "Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways." *J Biol Chem* 274(36): 25273-80.

- Li, M, Damuni, Z (1998). "I1PP2A and I2PP2A. Two potent protein phosphatase 2A-specific inhibitor proteins." *Methods Mol Biol* 93: 59-66.
- Lin, D, Sugawara, T, Strauss, JF, 3rd, Clark, BJ, Stocco, DM, Saenger, P, Rogol, A, Miller, WL (1995). "Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis." *Science* 267(5205): 1828-31.
- Liu, L, Yen, JH, Ganea, D (2007). "A novel VIP signaling pathway in T cells cAMP-->protein tyrosine phosphatase (SHP-2?)-->JAK2/STAT4-->Th1 differentiation." *Peptides* 28(9): 1814-24.
- Liu, Z, Stocco, DM (1997). "Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein." *Endocrinology* 138(7): 2722-8.
- Lorenz, S, Mattson, P (1986). "Cinematic observations of cultured adrenocortical tumor cells. Dynamic responses to ACTH and cytochalasin B." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 52(3): 221-36.
- Lotfi, CF, Todorovic, Z, Armelin, HA, Schimmer, BP (1997). "Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells." *J Biol Chem* 272(47): 29886-91.
- Lyons, PD, Dunty, JM, Schaefer, EM, Schaller, MD (2001). "Inhibition of the catalytic activity of cell adhesion kinase beta by protein-tyrosine phosphatase-PEST-mediated dephosphorylation." *J Biol Chem* 276(26): 24422-31.
- Maloberti, P, Castilla, R, Castillo, F, Maciel, FC, Mendez, CF, Paz, C, Podesta, EJ (2005). "Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis." *Febs J* 272(7): 1804-14.
- Manna, PR, Jo, Y, Stocco, DM (2007). "Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling." *J Endocrinol* 193(1): 53-63.
- Marchetti, S, Gimond, C, Chambard, JC, Touboul, T, Roux, D, Pouyssegur, J, Pages, G (2005). "Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation." *Mol Cell Biol* 25(2): 854-64.
- Markova, B, Herrlich, P, Ronnstrand, L, Bohmer, FD (2003). "Identification of protein tyrosine phosphatases associating with the PDGF receptor." *Biochemistry* 42(9): 2691-9.
- Mendelson, C, Dufau, M, Catt, K (1975). "Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells." *J Biol Chem* 250(22): 8818-23.
- Meng, K, Rodriguez-Pena, A, Dimitrov, T, Chen, W, Yamin, M, Noda, M, Deuel, TF (2000). "Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta

beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2603-8.

Metzler, B, Hu, Y, Sturm, G, Wick, G, Xu, Q (1998). "Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by arachidonic acid in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* 273(50): 33320-6.

Milligan, G, Kostenis, E (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S46-55.

Mishra, OP, Delivoria-Papadopoulos, M (2004). "Effect of hypoxia on the expression and activity of mitogen-activated protein (MAP) kinase-phosphatase-1 (MKP-1) and MKP-3 in neuronal nuclei of newborn piglets: the role of nitric oxide." *Neuroscience* 129(3): 665-73.

Misra-Press, A, Rim, CS, Yao, H, Roberson, MS, Stork, PJ (1995). "A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation." *J Biol Chem* 270(24): 14587-96.

Mooradian, AD, Morley, JE, Korenman, SG (1987). "Biological actions of androgens." *Endocr Rev* 8(1): 1-28.

Morfini, G, Szebenyi, G, Brown, H, Pant, HC, Pigino, G, DeBoer, S, Beffert, U, Brady, ST (2004). "A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons." *Embo J* 23(11): 2235-45.

Morimoto, RI, Kline, MP, Bimston, DN, Cotto, JJ (1997). "The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones." *Essays Biochem* 32: 17-29.

Murphy, BD, Lalli, E, Walsh, LP, Liu, Z, Soh, J, Stocco, DM, Sassone-Corsi, P (2001). "Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene." *Mol Endocrinol* 15(8): 1255-63.

Nagy, L, Freeman, DA (1990). "Effect of cholesterol transport inhibitors on steroidogenesis and plasma membrane cholesterol transport in cultured MA-10 Leydig tumor cells." *Endocrinology* 126(5): 2267-76.

Nguyen, TT, Scimeca, JC, Filloux, C, Peraldi, P, Carpentier, JL, 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(13): 9803-10.

Nichols, A, Camps, M, Gillieron, C, Chabert, C, Brunet, A, Wilsbacher, J, Cobb, M, Pouyssegur, J, Shaw, JP, Arkinstall, S (2000). "Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3." *J Biol Chem* 275(32): 24613-21.

- Nishizuka, Y (1984). "Turnover of inositol phospholipids and signal transduction." *Science* 225(4668): 1365-70.
- Obata, T, Brown, GE, Yaffe, MB (2000). "MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway." *Crit Care Med* 28(4 Suppl): N67-77.
- Palm-Leis, A, Singh, US, Herbelin, BS, Olsovsky, GD, Baker, KM, Pan, J (2004). "Mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatases mediate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the hypertrophic growth of cardiomyocytes." *J Biol Chem* 279(52): 54905-17.
- Papadopoulos, V, Baraldi, M, Guilarte, TR, Knudsen, TB, Lacapere, JJ, Lindemann, P, Norenberg, MD, Nutt, D, Weizman, A, Zhang, MR, Gavish, M (2006). "Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function." *Trends Pharmacol Sci* 27(8): 402-9.
- Papadopoulos, V, Brown, AS (1995). "Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis." *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 103-10.
- Papadopoulos, V, Brown, AS, Hall, PF (1990). "Calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cytoskeletal proteins from adrenal cells." *Mol Cell Endocrinol* 74(2): 109-23.
- Pawson, T, Gish, GD (1992). "SH2 and SH3 domains: from structure to function." *Cell* 71(3): 359-62.
- Paz, C, Cornejo Maciel, F, Maloberti, P, Walsh, LP, Stocco, DM, Podesta, EJ (2002). "Protein tyrosine phosphatases are involved in LH/chorionic gonadotropin and 8Br-cAMP regulation of steroidogenesis and StAR protein levels in MA-10 Leydig cells." *J Endocrinol* 175(3): 793-801.
- Paz, C, Cornejo Maciel, F, Mendez, C, Podesta, EJ (1999). "Corticotropin increases protein tyrosine phosphatase activity by a cAMP-dependent mechanism in rat adrenal gland." *Eur J Biochem* 265(3): 911-8.
- Paz, C, Maciel, FC, Poderoso, C, Gorostizaga, A, Podesta, EJ (2000). "An ACTH-activated protein tyrosine phosphatase (PTP) is modulated by PKA-mediated phosphorylation." *Endocr Res* 26(4): 609-14.
- Peraldi, P, Zhao, Z, Filloux, C, Fischer, EH, Van Obberghen, E (1994). "Protein-tyrosine-phosphatase 2C is phosphorylated and inhibited by 44-kDa mitogen-activated protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 5002-6.
- Pierson, RW, Jr. (1967). "Metabolism of steroid hormones in adrenal cortex tumor cultures." *Endocrinology* 81(4): 693-707.
- Poderoso, C, Converso, DP, Maloberti, P, Duarte, A, Neuman, I, Galli, S, Maciel, FC, Paz, C, Carreras, MC, Poderoso, JJ, Podesta, EJ (2008). "A Mitochondrial Kinase Complex Is Essential to Mediate an ERK1/2-Dependent

Phosphorylation of a Key Regulatory Protein in Steroid Biosynthesis." *PLoS ONE* 3(1): e1443.

Poderoso, C, Maciel, FC, Gorostizaga, A, Bey, P, Paz, C, Podesta, EJ (2002). "The obligatory action of protein tyrosine phosphatases in ACTH-stimulated steroidogenesis is exerted at the level of StAR protein." *Endocr Res* 28(4): 413-7.

Poderoso, C, Paz, C, Gorostizaga, A, Maciel, FC, Mendez, CF, Podesta, EJ (2002). "Protein serine/threonine phosphatase 2A activity is inhibited by cAMP in MA-10 cells." *Endocr Res* 28(4): 319-23.

Podesta, EJ, Dufau, ML, Solano, AR, Catt, KJ (1978). "Hormonal activation of protein kinase in isolated Leydig cells. Electrophoretic analysis of cyclic AMP receptors." *J Biol Chem* 253(24): 8994-9001.

Podesta, EJ, Milani, A, Steffen, H, Neher, R (1979). "Steroidogenesis in isolated adrenocortical cells. Correlation with receptor-bound adenosine e 3':5'-cyclic monophosphate." *Biochem J* 180(2): 355-63.

Pon, LA, Hartigan, JA, Orme-Johnson, NR (1986). "Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein." *J Biol Chem* 261(28): 13309-16.

Rae, PA, Gutmann, NS, Tsao, J, Schimmer, BP (1979). "Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4): 1896-900.

Ragolia, L, Begum, N (1998). "Protein phosphatase-1 and insulin action." *Mol Cell Biochem* 182(1-2): 49-58.

Raman, M, Chen, W, Cobb, MH (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." *Oncogene* 26(22): 3100-12.

Ray, P, Strott, CA (1978). "Stimulation of steroid synthesis by normal rat adrenocortical cells in response to antimicrotubular agents." *Endocrinology* 103(4): 1281-8.

Reinhart, AJ, Williams, SC, Clark, BJ, Stocco, DM (1999). "SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter." *Mol Endocrinol* 13(5): 729-41.

Reyland, ME (1993). "Protein kinase C is a tonic negative regulator of steroidogenesis and steroid hydroxylase gene expression in Y1 adrenal cells and functions independently of protein kinase A." *Mol Endocrinol* 7(8): 1021-30.

Rhee, SG, Chang, TS, Bae, YS, Lee, SR, Kang, SW (2003). "Cellular regulation by hydrogen peroxide." *J Am Soc Nephrol* 14(8 Suppl 3): S211-5.

- Rocchi, S, Gaillard, I, van Obberghen, E, Chambaz, EM, Vilgrain, I (2000). "Adrenocorticotrophic hormone stimulates phosphotyrosine phosphatase SHP2 in bovine adrenocortical cells: phosphorylation and activation by cAMP-dependent protein kinase." *Biochem J* 352 Pt 2: 483-90.
- Rohan, PJ, Davis, P, Moskaluk, CA, Kearns, M, Krutzsch, H, Siebenlist, U, Kelly, K (1993). "PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase." *Science* 259(5102): 1763-6.
- Rosini, P, De Chiara, G, Bonini, P, Lucibello, M, Marcocci, ME, Garaci, E, Cozzolino, F, Torcia, M (2004). "Nerve growth factor-dependent survival of CESS B cell line is mediated by increased expression and decreased degradation of MAPK phosphatase 1." *J Biol Chem* 279(14): 14016-23.
- Roux, PP, Blenis, J (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 320-44.
- Ryser, S, Tortola, S, Schlegel, W (2002). "Map kinase phosphatase-1 gene expression and regulation in neuroendocrine cells." *J Recept Signal Transduct Res* 22(1-4): 17-29.
- Sackett, DL, Wolff, J (1986). "Cyclic AMP-independent stimulation of steroidogenesis in Y-1 adrenal tumor cells by antimitotic agents." *Biochim Biophys Acta* 888(2): 163-70.
- Sala, GB, Dufau, ML, Catt, KJ (1979). "Gonadotropin action in isolated ovarian luteal cells. The intermediate role of adenosine 3':5'-monophosphate in hormonal stimulation of progesterone synthesis." *J Biol Chem* 254(6): 2077-83.
- Saltarelli, D, De la Llosa-Hermier, MP, Tertrin-Clary, C, Hermier, C (1984). "Effects of antimicrotubular agents in cAMP production and in steroidogenic response of isolated rat Leydig cells." *Biol Cell* 52(3): 259-66.
- Sampson, LJ, Davies, LM, Barrett-Jolley, R, Standen, NB, Dart, C (2007). "Angiotensin II-activated protein kinase C targets caveolae to inhibit aortic ATP-sensitive potassium channels." *Cardiovasc Res*.
- Saxena, M, Mustelin, T (2000). "Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase." *Semin Immunol* 12(4): 387-96.
- Sayed, SB, Whitehouse, BJ, Jones, PM (1997). "Phosphoserine/threonine phosphatases in the rat adrenal cortex: a role in the control of steroidogenesis?" *J Endocrinol* 154(3): 449-58.
- Schievella, AR, Paige, LA, Johnson, KA, Hill, DE, Erikson, RL (1993). "Protein tyrosine phosphatase 1B undergoes mitosis-specific phosphorylation on serine." *Cell Growth Differ* 4(4): 239-46.
- Schimmer, BP (1979). "Adrenocortical Y1 cells." *Methods Enzymol* 58: 570-4.

Schimmer, BP (1995). "The 1994 Upjohn Award Lecture. Molecular and genetic approaches to the study of signal transduction in the adrenal cortex." *Can J Physiol Pharmacol* 73(8): 1097-107.

Schlessinger, J, Lemmon, MA (2006). "Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring." *Cell* 127(1): 45-8.

Schliess, F, Kurz, AK, Haussinger, D (2000). "Glucagon-induced expression of the MAP kinase phosphatase MKP-1 in rat hepatocytes." *Gastroenterology* 118(5): 929-36.

Scholer, D, Birkhauser, M, Peytremann, A, Riondel, AM, Vallotton, MB, Muller, AF (1973). "Response of plasma aldosterone to angiotensin II, ACTH and potassium in man." *Acta Endocrinol (Copenh)* 72(2): 293-307.

Sedej, S, Rose, T, Rupnik, M (2005). "cAMP increases Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices." *J Physiol* 567(Pt 3): 799-813.

Seely, BL, Staubs, PA, Reichart, DR, Berhanu, P, Milarski, KL, Saltiel, AR, Kusari, J, Olefsky, JM (1996). "Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor." *Diabetes* 45(10): 1379-85.

Sewer, MB, Waterman, MR (2002). "Adrenocorticotropin/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcription of the human CYP17 gene in the adrenal cortex is dependent on phosphatase activity." *Endocrinology* 143(5): 1769-77.

Sewer, MB, Waterman, MR (2002). "cAMP-dependent transcription of steroidogenic genes in the human adrenal cortex requires a dual-specificity phosphatase in addition to protein kinase A." *J Mol Endocrinol* 29(1): 163-74.

Sewer, MB, Waterman, MR (2003). "ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex." *Microsc Res Tech* 61(3): 300-7.

Sewer, MB, Waterman, MR (2003). "cAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells." *J Biol Chem* 278(10): 8106-11.

Shchemelinin, I, Sefc, L, Necas, E (2006). "Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases." *Folia Biol (Praha)* 52(3): 81-100.

Shen, Y, Lyons, P, Cooley, M, Davidson, D, Veillette, A, Salgia, R, Griffin, JD, Schaller, MD (2000). "The noncatalytic domain of protein-tyrosine phosphatase-PEST targets paxillin for dephosphorylation in vivo." *J Biol Chem* 275(2): 1405-13.

Shenolikar, S (1994). "Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation." *Annu Rev Cell Biol* 10: 55-86.

- Shiver, TM, Sackett, DL, Knipling, L, Wolff, J (1992). "Intermediate filaments and steroidogenesis in adrenal Y-1 cells: acrylamide stimulation of steroid production." *Endocrinology* 131(1): 201-7.
- Shuai, K, Schindler, C, Prezioso, VR, Darnell, JE, Jr. (1992). "Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein." *Science* 258(5089): 1808-12.
- Silva, CM (2004). "Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis." *Oncogene* 23(48): 8017-23.
- Sim, AT, Scott, JD (1999). "Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains." *Cell Calcium* 26(5): 209-17.
- Simpson, E, Lauber, M, Demeter, M, Stirling, D, Rodgers, R, Means, G, Mahendroo, M, Kilgore, M, Mendelson, C, Waterman, M (1991). "Regulation of expression of the genes encoding steroidogenic enzymes." *J Steroid Biochem Mol Biol* 40(1-3): 45-52.
- Skalhegg, BS, Tasken, K (2000). "Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA." *Front Biosci* 5: D678-93.
- Smith, FD, Scott, JD (2006). "Anchored cAMP signaling: onward and upward - a short history of compartmentalized cAMP signal transduction." *Eur J Cell Biol* 85(7): 585-92.
- Soderling, TR (1990). "Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains." *J Biol Chem* 265(4): 1823-6.
- Steckelbroeck, S, Watzka, M, Stoffel-Wagner, B, Hans, VH, Redel, L, Clusmann, H, Elger, CE, Bidlingmaier, F, Klingmuller, D (2001). "Expression of the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 mRNA in the human brain." *Mol Cell Endocrinol* 171(1-2): 165-8.
- Stocco, DM (2001). "StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis." *Annu Rev Physiol* 63: 193-213.
- Stocco, DM, Clark, BJ (1996). "Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells." *Endocr Rev* 17(3): 221-44.
- Stocco, DM, Clark, BJ (1996). "Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis." *Biochem Pharmacol* 51(3): 197-205.
- Stocco, DM, Clark, BJ, Reinhart, AJ, Williams, SC, Dyson, M, Dassi, B, Walsh, LP, Manna, PR, Wang, XJ, Zeleznik, AJ, Orly, J (2001). "Elements involved in the regulation of the StAR gene." *Mol Cell Endocrinol* 177(1-2): 55-9.
- Stoker, A (2005). "Methods for identifying extracellular ligands of RPTPs." *Methods* 35(1): 80-9.



- Stoker, AW (2005). "Protein tyrosine phosphatases and signalling." *J Endocrinol* 185(1): 19-33.
- Streuli M (1996). "Protein tyrosine phosphatases in signaling." *Curr Opin Cell Biol. Apr*;8(2):182-8.
- Sugden, PH, Clerk, A (1997). "Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors." *Cell Signal* 9(5): 337-51.
- Tajima, K, Dantes, A, Yao, Z, Sorokina, K, Kotsuji, F, Seger, R, Amsterdam, A (2003). "Down-regulation of steroidogenic response to gonadotropins in human and rat preovulatory granulosa cells involves mitogen-activated protein kinase activation and modulation of DAX-1 and steroidogenic factor-1." *J Clin Endocrinol Metab* 88(5): 2288-99.
- Tanoue, T, Yamamoto, T, Nishida, E (2002). "Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases." *J Biol Chem* 277(25): 22942-9.
- Tao, J, Malbon, CC, Wang, HY (2001). "Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo." *J Biol Chem* 276(31): 29520-5.
- Temple, R, Wolff, J (1973). "Stimulation of steroid secretion by antimicrotubular agents." *J Biol Chem* 248(8): 2691-8.
- Tiganis, T, Bennett, AM (2007). "Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective." *Biochem J* 402(1): 1-15.
- Tonks, NK (2006). "Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(11): 833-46.
- Tonks, NK, Diltz, CD, Fischer, EH (1988). "Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta." *J Biol Chem* 263(14): 6731-7.
- Torres, J, Blanco-Aparicio, C, Pulido, R (2004). "Regulation of MAPK cascades by protein tyrosine phosphatases." *Methods Mol Biol* 250: 103-12.
- Towbin, H, Staehelin, T, Gordon, J (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.
- Trinkle-Mulcahy, L, Lamond, AI (2006). "Mitotic phosphatases: no longer silent partners." *Curr Opin Cell Biol* 18(6): 623-31.
- Uchida, T, Matozaki, T, Noguchi, T, Yamao, T, Horita, K, Suzuki, T, Fujioka, Y, Sakamoto, C, Kasuga, M (1994). "Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains." *J Biol Chem* 269(16): 12220-8.
- Valentino, L, Pierre, J (2006). "JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies." *Biochem Pharmacol* 71(6): 713-21.

- Vermeulen, K, Berneman, ZN, Van Bockstaele, DR (2003). "Cell cycle and apoptosis." *Cell Prolif* 36(3): 165-75.
- Vilgrain, I, Cochet, C, Chambaz, EM (1984). "Hormonal regulation of a calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase in bovine adrenal cortex." *J Biol Chem* 259(6): 3403-6.
- Vilgrain, I, Chinn, A, Gaillard, I, Chambaz, EM, Feige, JJ (1998). "Hormonal regulation of focal adhesions in bovine adrenocortical cells: induction of paxillin dephosphorylation by adrenocorticotrophic hormone." *Biochem J* 332 (Pt 2): 533-40.
- Wang, X, Grammatikakis, N, Siganou, A, Stevenson, MA, Calderwood, SK (2004). "Interactions between extracellular signal-regulated protein kinase 1, 14-3-3epsilon, and heat shock factor 1 during stress." *J Biol Chem* 279(47): 49460-9.
- Wang, X, Shen, CL, Dyson, MT, Yin, X, Schiffer, RB, Grammas, P, Stocco, DM (2006). "The involvement of epoxygenase metabolites of arachidonic acid in cAMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression." *J Endocrinol* 190(3): 871-8.
- Wang, Y, Guo, W, Liang, L, Esselman, WJ (1999). "Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. Modulation of activity and mutational analysis." *J Biol Chem* 274(11): 7454-61.
- Watanabe, G, Pena, P, Albanese, C, Wilsbacher, LD, Young, JB, Pestell, RG (1997). "Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo." *J Biol Chem* 272(32): 20063-9.
- Winnay, JN, Hammer, GD (2006). "Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation." *Mol Endocrinol* 20(1): 147-66.
- Wu, JH, Goswami, R, Cai, X, Exum, ST, Huang, X, Zhang, L, Brian, L, Premont, RT, Peppel, K, Freedman, NJ (2006). "Regulation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-5 in vascular smooth muscle cells involves the phosphatase Shp2." *J Biol Chem* 281(49): 37758-72.
- Xie, H, Clarke, S (1994). "Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain." *J Biol Chem* 269(3): 1981-4.
- Yasumura, Y, Buonassisi, V, Sato, G (1966). "Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype." *Cancer Res* 26(3): 529-35.
- Zeng, L, D'Alessandri, L, Kalousek, MB, Vaughan, L, Pallen, CJ (1999). "Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalpha) and contactin form a novel neuronal receptor complex linked to the intracellular tyrosine kinase fyn." *J Cell Biol* 147(4): 707-14.

Zhang, ZY, Dixon, JE (1994). "Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 68: 1-36.

Zhou, B, Wu, L, Shen, K, Zhang, J, Lawrence, DS, Zhang, ZY (2001). "Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2." *J Biol Chem* 276(9): 6506-15.

Zhu, T, Matsuzawa, S, Mizuno, Y, Kamibayashi, C, Mumby, MC, Andjelkovic, N, Hemmings, BA, Onoe, K, Kikuchi, K (1997). "The interconversion of protein phosphatase 2A between PP2A1 and PP2A0 during retinoic acid-induced granulocytic differentiation and a modification on the catalytic subunit in S phase of HL-60 cells." *Arch Biochem Biophys* 339(1): 210-7.

Parte de los resultados incluidos en este Trabajo de Tesis Doctoral han dado origen a presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales y a las publicaciones que se detallan a continuación:

1. Adrenocorticotropin induces MAP kinase phosphatase (MKP)-1 in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. **Gorostizaga AB**, Bey P, Maloberti Pa M, Castilla Lozano R, Poderoso C, Cornejo Maciel F, Podestá EJ, Paz C. *Endocrinology*. 2003;144(4):1399-406.
2. Molecular events triggered by heat shock in Y1 adrenocortical cells. **Gorostizaga A**, Brion L, Maloberti P, Poderoso C, Podesta EJ, Maciel FC, Paz C. *Endocr Res*. 2004 Nov;30(4):655-9.
3. Heat shock triggers MAPK activation and MKP-1 induction in Leydig testicular cells. **Gorostizaga A**, Brion L, Maloberti P, Maciel FC, Podesta EJ, Paz C. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Feb 4;327(1):23-8.
4. Tyrosine phosphatases in steroidogenic cells: regulation and function. **Gorostizaga A**, Cornejo Maciel F, Brion L, Maloberti P, Podesta EJ, Paz C. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Feb;265-266:131-7. Epub 2007 Jan 5.