

Tesis Doctoral

Regulación hormonal y papel funcional de la map quinasa fosfatasa-1 (MKP-1) en células esteroidogénicas

Brion, Laura

2010

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

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

Cita tipo APA:

Brion, Laura. (2010). Regulación hormonal y papel funcional de la map quinasa fosfatasa-1 (MKP-1) en células esteroidogénicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Brion, Laura. "Regulación hormonal y papel funcional de la map quinasa fosfatasa-1 (MKP-1) en células esteroidogénicas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**REGULACIÓN HORMONAL Y PAPEL FUNCIONAL DE
LA MAP QUINASA FOSFATASA-1 (MKP-1) EN
CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Área: Ciencias Biológicas

Laura Brion

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

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas (IIMHNO). Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2010

REGULACIÓN HORMONAL Y PAPEL FUNCIONAL DE LA MAP QUINASA FOSFATASA-1 (MKP-1) EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

Las MAP quinasas fosfatasas (MKPs) son componentes regulatorios importantes en aquellos procesos fisiológicos en los cuales participan las MAPKs debido a su capacidad de inactivar específicamente a estas enzimas. En este trabajo se analizó el rol funcional y la regulación transcripcional y post-traducciona de MKP-1 en células esteroideogénicas.

Demostramos que hCG y AMPc incrementan los niveles de MKP-1 por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales. Los resultados obtenidos indican que hCG/AMPc promueven la fosforilación de MKP-1 por acción de PKA y ERK1/2 y que esta modificación promueve su estabilización. También demostramos que esta fosfatasa se localiza tanto en núcleo como en mitocondrias. En lo que respecta al papel funcional de MKP-1, se comprobó que la expresión de MKP-1 inhibe la producción de esteroides por su capacidad de interferir con la inducción de StAR, una proteína clave para la esteroideogénesis.

En conclusión, en este trabajo demostramos que LH/ACTH, además de promover la activación de enzimas necesarias para la síntesis de esteroides como ERK1/2, también dispara la activación de mecanismos que contribuyen a la inactivación de esta enzima. Se concluye que el aumento en la expresión de MKP-1 y la estabilización de la proteína por acción de hCG/AMPc es un mecanismo clave para el cierre de la acción hormonal sobre la esteroideogénesis.

Palabras claves: MKP-1, Fosforilación, LH, Esteroideogénesis, StAR.

HORMONAL REGULATION AND FUNCTIONAL ROLE OF MAP KINASE PHOSPHATASE-1 (MKP-1) IN STEROIDOGENIC CELLS

MAP kinase phosphatases (MKPs) are important regulatory components in the physiological processes in which the MAPKs are involved, due to its ability to inactivate specifically these enzymes. In this study we have analyzed the functional role and transcriptional and post-translational regulation of MKP-1 in steroidogenic cells.

We show that hCG and cAMP increase MKP-1 levels by transcriptional and post-translational mechanisms. The results indicate that hCG/cAMP promotes MKP-1 phosphorylation by PKA and ERK1/2 action and that this modification promotes its stabilization. We also show that this phosphatase is localized in nucleus and mitochondria. Regarding the functional role of MKP-1, it was found that the expression of MKP-1 inhibits the production of steroids by its ability to interfere with the induction of StAR, a key protein for steroidogenesis.

In conclusion, in this work we demonstrate that LH/ACTH, in addition of promoting the activation of ERK1/2, which is necessary for steroid synthesis, also triggers the activation of mechanisms that contribute to the inactivation of this enzyme. We show the increased expression of MKP-1 and stabilization of the protein by hCG/cAMP action, as a key mechanism for the closure of hormone action on steroidogenesis.

Key words: MKP-1, Phosphorylation, LH, Steroidogenesis, StAR.

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Cristina Paz por tantos años compartidos trabajando juntas, por inculcarme el amor y la pasión por la ciencia, por su incansable búsqueda de respuestas y sobre todas las cosas, por su amor y buena onda constantes.

Al Dr. Ernesto Podestá, por sus invaluable aportes ideológicos a este trabajo de tesis y sus sabios consejos tanto en el ámbito científico como en ámbito personal.

A Paula Maloberti, más que mil gracias. Gracias por el tiempo brindado, por la ayuda, por los consejos y por la excelente predisposición que tuviste para que esta tesis terminara con un final feliz!! Gracias por enseñarme día a día a como ser mejor en esto que elegí ser, una científica argentina.

A Ale Goros, mi compañera de mesada, mi amiga, mil gracias por tu aporte invaluable a la escritura de esta tesis!! Por el tiempo invertido y sincera preocupación. Gracias por las charlas sobre la vida, por los aromas, por los café martinez y sobre todas las cosas por... estar!

A Rocio, Fer y Ceci P, les agradezco juntas porque las tres me han ayudado siempre que lo necesité, son realmente excelentes compañeras de trabajo. Gracias por los consejos, las sugerencias y por brindarme su tiempo cuando necesitaba resolver algún problemita científico.

A Guada, mi ex compa de mesada y amiga. Extraño mucho nuestras ingenuas y gratificantes charlas de ciencia y de la vida en su totalidad. Sos una genia y te re extraño!

A Ale Duarte, por compartir conmigo los comienzos en el lab, por tu ayuda siempre, y fundamentalmente en las presentaciones a congresos!! In-va-lo-ra-ble. Que somos??!!

A Andre, gracias por tu amistad, por tus consejos y tu buena onda todos estos años!

A mis "noveles" compas de lab, Nati y Mechi. Nati, gracias por compartir una visión de la vida muy similar, por escucharme y aconsejarme y por actualizar mi repertorio de música

que es t3pico fundamental en mi vida. A Mechi, gracias por encargarte siempre de resolver los problemas de orden, limpieza y por recordarme siempre de los beneficios de la tarjeta club la naci3n.

A Hern3n, por ser una excelente persona, compa1ero y amigo, por tus palabras y ayuda en los momentos dif3ciles y por tu buena onda "constitutiva"!!

A Charly, porque es un referente tanto en el 3mbito cient3fico como acad3mico y en el 3mbito personal tambi3n. Gracias por tu tiempo y genuina preocupaci3n en el desarrollo de esta tesis, por tener una visi3n 3nica de las cosas.

A Fabiana por su invaluable contribuci3n a la escritura de este trabajo, muchas gracias! Nunca pense que un ser humano pod3a diferenciar esto ":" de esto ":".

A Pablo, tambi3n por tu ayuda y el tiempo invertido en la lectura de esta tesis, ya casi se de memoria donde poner acentos y donde no. Tambi3n gracias por brindarnos miles de pel3culas semanalmente.

A Ulises, por demostrarme que existen buenos compa1eros, siempre dispuesto a compartir sus opiniones y consejos y "no" gracias cuando tenes que pasar todos tus clones y nos mentis vilmente con un..."en 20 minutos termino".

A Isabel, por compartir temas relacionados con metodolog3as noveles en el cuidado de la est3tica. Grande Isa!

A Mariana Cooke, por estos 3ltimos meses de trabajo compartiendo una infinidad de t3cnicas y vicitudes!

A Jesica por prestarme siempre algo cuando lo necesité (y que todav3a no devolví), vamos que ya falta poco para vos tambi3n licenciada.

A la Dra. Silvia Gonzalez por el préstamo de su becaria y a la flamante Dra. Candela Gonzalez, mil gracias por la ayuda invaluable con los experimentos de Real Time PCR, por tantísima buena onda sin fines de lucro!!

A mi compañera de congresos internacionales y de interesantes cursos de post-grado, Cami, gracias por tu compañía y buena onda!

A la Dra. Cora Cymering y a los chicos de su lab, Paco y Martin, por los plásmidos y algunos μ l de Lipofectamina prestados!

A Andy Randi, Laura Alvarez, Rodolfo y Marce, los mayores del laboratorio K porque siempre, siempre nos prestan algún reactivo fundamental para el desarrollo de alguna técnica y por su buena onda.

A las Dras. Juana y Laura Pasquini por el préstamo desinteresado de unos reactivos utilizados en esta tesis.

A los patológicos, Ceci Calata, Julia, Violeta, Lucas, Mariano G y Vicky por su ayuda prestándome reactivos, llaves y fundamentalmente por la buena onda.

A mis compañeros de facu, Juli, Julio, Robert, Daro y Dani (y Romi) por tan lindos momentos compartidos de hace años, con ustedes transité uno de los momentos más lindos de mi vida y a pesar de no vernos tan seguido los tengo muy presentes y los adoro!

A tres personas que tengo muy adentro en mi corazón, mi amiga del alma Vero, mi primo del alma Leo y mi otra amiga del alma Lulilu, ustedes son un pilar fundamental en mi vida, los quiero tener cerca siempre!

A Sole!!! Porque sí! Porque sos un re ejemplo a seguir científicamente hablando, gracias por tus consejos, siempre certeros y por recordarme disfrutar esta etapa de mi carrera. Te extraño mucho Tali!

Por último a mi familia, mis padres, Mari y Edu por el apoyo incondicional durante toda mi carrera, por fomentar el estudio en mi vida desde pequeña, por bancarme en todos los aspectos, por quererme y cuidarme tanto. A fer mi hermanito también por quererme tanto y cuidarme y solventar gastos administrativos! A los tres, muchas gracias y los quiero mucho!

A Mary, Edu y Fer

Act D: Actinomicina D
Acot2: Acil-CoA tioesterasa mitocondrial
Acsl4: Acil-CoA sintetasa 4
ACTH: Hormona adrenocorticotrofina
ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia
AKAP: A-kinase anchoring protein
AMPc: Adenosina 3', 5' monofosfato
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ATP: Adenosina trifosfato
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-tetracético
EGFP: Enhanced green fluorescent protein
EDTA: Ácido etilén diamino tetra-acético
EGTA: Ácido etilén glicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetraacético
ERKs: Quinasas reguladas por señales extracelulares
ERK1/2: Extracellular-regulated kinase 1 y 2
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP: Guanosina difosfato
GTP: Guanosina trifosfato
hCG: Gonadotropina coriónica humana
H89: (N-[2-(p-bromocinamilamino)-etil]-5-isoquinolinasulfonamida)
IPs: Inmunoprecipitados
IPTG: Isipropil-tio-β-galactósido
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

MEK1/2: MAP quinasa quinasa (MAPKK) de ERK1/2

PBS: Solución salina de fosfato

PBR: Peripheral-type benzodiazepine receptor

PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc

PMSF: Floruro de fenil-metil-sulfonilo

PVDF: Poli floruro de vinilideno

P450scc: Complejo enzimático de escisión de la cadena lateral del colesterol

P4: Progesterona

P5: Pregnenolona

PSTPs: Serina/treonina fosfatasas

PTPs; Proteína tirosina fosfatasas "clásicas"

pGT: Poli-glutámico-tirosina

PKC: Proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos

PLC: Fosfolipasa C

RIA: Radioinmunoanálisis

Raf: MAP quinasa quinasa quinasa (MEKK)

SDS: Duodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforésis en geles de poliacrilamida con SDS

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein

TAE: Solución acetato EDTA

TSPO: Translocator protein

VDAC: Voltage-dependent anion-selective channel

8Br-AMPc: 8 bromo-3', 5'-AMPc

22(R)OH colesterol: 22 α -hidroxicolesterol

7TMS: Siete regiones transmembrana

<u>INTRODUCCIÓN</u>	Pag.
I. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	1
I.1. GENERALIDADES	1
I.2. RECEPTORES HORMONALES	3
I.3. PROTEÍNAS G Y SEGUNDOS MENSAJEROS	4
I.4. PROTEÍNAS QUINASAS	6
I.4.1. Proteínas Tirosina Quinasas	6
I.4.2. Proteínas Serina/Treonina Quinasas	7
I.4.2. a. Proteína Quinasa dependiente de AMPc	8
I.4.2. b. Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos	9
- <i>Clasificación</i>	9
- <i>Mecanismo de activación y regulación de la actividad de las MAPKs</i>	9
- <i>Sustratos de las MAPKs</i>	13
- <i>Sitios de anclaje a las MAPKs</i>	13
I.5. PROTEÍNAS FOSFATASAS	14
I.5.1. Proteínas Serina/Treonina Fosfatasas	14
I.5.2. Proteínas Tirosina Fosfatasas	15
I.5.2. a. Proteínas PTPs “clásicas” o PTPs	15
I.5.2. b. Proteínas Fosfatasas de Actividad Dual	19
- <i>Clasificación</i>	19
- <i>Estructura de las MKPs</i>	20
- <i>Regulación transcripcional y post-traducciona l de las MKPs</i>	21
- <i>Mecanismo de acción</i>	23
- <i>Función biológica</i>	24
II. SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES Y REGULACIÓN HORMONAL DEL PROCESO	25
II.1. TEJIDOS PRODUCTORES DE HORMONAS ESTEROIDES	25
- <i>Testículo</i>	25
- <i>Glándula adrenal</i>	26
- <i>Otros tejidos productores de esteroides</i>	27
II.2. BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES	28

II.3. HORMONAS ESTEROIDOGÉNICAS Y SU MECANISMO DE ACCIÓN	31
II.3. a. Hormonas Esteroidogénicas	31
II.3. b. Mecanismo de transducción de señales disparado por LH y ACTH	32
- <i>Participación de PKA en el mecanismo de acción de LH y ACTH</i>	32
- <i>Las MAPKs en el mecanismo de acción de LH y ACTH</i>	33
II.4. REGULACIÓN HORMONAL AGUDA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS	34
II.4. a. Papel de la síntesis proteica en la regulación hormonal de la esteroidogénesis	34
II.4. b. Proteínas intermediarias en la regulación aguda de la esteroidogénesis	36
- <i>Receptor periférico de benzodiazepinas / Translocator protein</i>	36
- <i>Proteína StAR</i>	37
II.5. REGULACIÓN HORMONAL DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE STAR	38
II.5. a. Regulación de la expresión de StAR	38
- <i>Rol del ácido araquidónico en la regulación de StAR</i>	38
- <i>Secuencias antisentido naturales en la regulación de StAR</i>	39
- <i>Factores de transcripción que participan en la expresión de StAR</i>	40
- <i>Rol de PKA y ERK1/2 en la inducción de StAR</i>	42
II.5. b. Regulación de la actividad de StAR	43
III. PROTEÍNAS FOSFATASAS EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS	44
III.1. REGULACIÓN DE PROTEÍNAS FOSFATASAS EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS	44
III.1. a. Regulación de Proteínas Serina/Treonina Fosfatasas por LH/ACTH	44
III.1. b. Regulación de Proteínas Tirosina Fosfatasas por LH/ACTH	46
III.1. c. Regulación de Proteínas Fosfatasas Duales por LH/ACTH	47
III.2. FUNCIÓN DE PROTEÍNAS FOSFATASAS EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS	48
III.2. a. Participación de PTPs en la regulación de la esteroidogénesis	48
III.2. b. Participación de MKP-1 en la regulación de la esteroidogénesis	50
<u>OBJETIVOS</u>	53

<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	55
I. REACTIVOS UTILIZADOS	55
II. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	56
- <i>Plásmidos utilizados</i>	56
- <i>Electroforesis en geles de agarosa</i>	59
- <i>Purificación de fragmentos de ADN</i>	59
- <i>Ligación en el plásmido pGEM[®]-T Easy</i>	59
- <i>Digestión con endonucleasas de restricción</i>	60
- <i>Desfosforilación de vectores y reacción de ligación</i>	60
- <i>Cepas bacterianas y medios de cultivo de bacterias</i>	60
- <i>Preparación de bacterias competentes</i>	61
- <i>Transformación de Escherichia coli competentes</i>	61
- <i>Aislamiento y purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (MINIPREP)</i>	62
- <i>Aislamiento y purificación de ADN plasmídico a mediana escala (MIDIPREP)</i>	62
III. LÍNEAS CELULARES	63
IV. ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO	64
V. INCORPORACIÓN DE [³² P] FOSFATO EN CÉLULAS EN CULTIVO	64
VI. OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES	64
VII. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE TIROSINA FOSFATASA EN LISADOS CELULARES	65
- <i>Fosforilación de poli-glutámico-tirosina</i>	65
- <i>Ensayo de actividad de tirosina fosfatasa</i>	65
VIII. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	66
- <i>Determinación de proteínas por el método de Bradford</i>	66
- <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</i>	66
- <i>Western blot</i>	67
- <i>Fraccionamiento subcelular: obtención de fracción mitocondrial y nuclear</i>	67
- <i>Medición de actividad de lactato deshidrogenasa</i>	68
- <i>Inmunoprecipitación</i>	68
IX. ANÁLISIS DEL ARN Y ADN	69

- Extracción de ARN total	69
- Reacción de transcripción reversa (RT)	69
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	70
- Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa (PCR semicuantitativa)	71
- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real-time PCR)	72
X. OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN DE MKP-1	73
- Obtención de los vectores de expresión pRc/CMV-MKP-1 sentido y antisentido	73
- Obtención del vector de expresión p3XFLAG-MKP-1	73
XI. OBTENCIÓN DE UN VECTOR DE EXPRESIÓN DE ARNs PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA DE MKP-1	74
XII. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LAS LÍNEAS CELULARES	75
XIII. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA	75
XIV. INMUNOCITOQUÍMICA	76
XV. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)	77
XVI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
<u>RESULTADOS</u>	78
I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MKP-1 POR ACCIÓN HORMONAL EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS	78
I.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MKP-1 POR LH/hCG	78
I.2. EFECTO DE LH/hCG SOBRE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA MKP-1	83
I.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA MKP-1	86
I.4. REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE MKP-1 POR ACCIÓN HORMONAL	87
I.4. a. Estrategia utilizada para la sobre-expresión transitoria de MKP-1	87
I.4. b. Localización de la proteína flag-MKP-1	90
I.4. c. Efecto de la inhibición del proteasoma sobre los niveles de MKP-1	92
I.4. d. Efecto de hCG sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1	94
I.4. e. Participación de PKA y ERK1/2 en la regulación hormonal de la proteína MKP-1 en células de Leydig	98
I.4. f. Fosforilación de MKP-1 por acción hormonal en células de Leydig	101

I.4. g. Efecto de ACTH sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células adrenocorticales Y1	103
II. ROL FUNCIONAL DE MKP-1 EN LA REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS	107
II.1. ESTRATEGIA PARA EL ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE MKP-1 EN LA REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS	107
II.1. a. Diseño y validación de las construcciones utilizadas para modificar el grado de expresión de la proteína MKP-1	107
II.1. b. Diseño y validación de la construcción utilizada para disminuir la expresión de la proteína MKP-1 mediante siRNA	110
II.1. c. Determinación de la actividad de tirosina fosfatasas en células que sobre-expresan MKP-1	111
II.1. d. Efecto de la sobre-expresión o inhibición de la expresión de MKP-1 sobre el grado de fosforilación de ERK1/2	113
II.2. EFECTO DE MKP-1 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10	115
II.3. EFECTO DE MKP-1 SOBRE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES RELACIONADOS CON LA ESTEROIDOGÉNESIS	117
II.3. a. Efecto de MKP-1 sobre la expresión de StAR	117
II.3. b. Efecto de MKP-1 sobre la actividad del promotor de NUR77	121
II.3. c. Efecto de MKP-1 sobre la actividad del promotor del CYP11A1	124
<u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	127
I. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POST-TRADUCCIONAL DE MKP-1 EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS	127
II. ROL DE MKP-1 EN LA ESTEROIDOGÉNESIS	132
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	139

INTRODUCCIÓN

I. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

I.1. GENERALIDADES

Una de las principales características de los organismos vivos es su capacidad de adaptarse a los continuos cambios del medio ambiente para garantizar su supervivencia. Esta necesidad de adaptación ha permitido el desarrollo en los distintos organismos vivos, desde los organismos unicelulares hasta los organismos pluricelulares más complejos, de sistemas apropiados para sentir la información del medio que les rodea y responder apropiadamente. Estos mecanismos y la capacidad de los organismos de elaborar respuestas altamente específicas en el marco temporal apropiado aseguran la homeostasis. Los cambios en el medio ambiente, que denominaremos señales extracelulares, comprenden diversos estímulos, que pueden ser físicos o químicos.

Algunas de las señales de naturaleza física pueden ser cambios en la temperatura del medio, estrés osmótico o presencia de drogas en el medio extracelular. Está ampliamente documentado que el incremento de la temperatura del medio conduce a un aumento en la expresión de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP), con la consecuente alteración en el patrón de expresión génica, y en algunos casos, de proteínas relacionadas con la vía de las MAPKs [1]. En lo que respecta al estrés osmótico, es conocido que la exposición de determinadas células a condiciones de osmolaridad variable conduce a respuestas adaptativas que involucran cambios en el perfil de expresión de genes [2].

Con respecto a las señales extracelulares de origen químico podemos mencionar moléculas de naturaleza muy diversa tales como proteínas, péptidos, aminoácidos, esteroides, derivados de ácidos grasos y hasta gases disueltos, como el óxido nítrico y el monóxido de carbono. Un ejemplo de este tipo de señales es el constituido por las hormonas proteicas luteinizante (LH) y adrenocorticotrofina (ACTH), las cuales promueven, a través de la expresión de diferentes genes, la síntesis de esteroides en sus respectivos tejidos blanco [3, 4]. Otras moléculas pequeñas y de naturaleza gaseosa como el óxido nítrico y el monóxido de carbono también actúan como importantes estímulos celulares [5].

El conjunto de procesos por el cual una señal extracelular es transformada en una señal intracelular se conoce como mecanismo de transducción de señales. Este mecanismo por el cual las señales extracelulares conducen a una respuesta específica por parte de la célula involucra al menos tres pasos: en primer lugar, la captación de las señales externas en la superficie celular, mediante los receptores de membrana, o mediante receptores intracelulares en el caso de que la señal atravesase libremente la membrana de la célula. En segundo lugar, la generación y la transmisión intracelular de las señales por medio de interacciones proteína-proteína, y por último, la ejecución de la respuesta.

Aunque la variedad de señales tanto físicas como químicas a las cuales las células pueden responder es extremadamente amplia, la evolución ha seleccionado y perfeccionado sólo una serie limitada de cadenas de transducción de señales capaces de generar una respuesta apropiada para cada estímulo en diferentes tipos celulares. Esta convergencia en unas pocas cascadas de transducción, comunes en plantas y animales, ocurre en primer lugar en los dominios efectores de los receptores celulares, los que están representados por unos pocos tipos fundamentales de los cuales se hablará más adelante.

Por otro lado cada tipo celular presenta maquinarias efectoras específicas, de tal forma que las señales generadas en la cascada de transducción de dos o más estímulos, aún siendo idénticos, pueden activar una respuesta distinta en cada tipo celular. Esta maquinaria de señalización está conformada por una diversidad de enzimas, en su mayoría proteínas quinasas y fosfatasas. Quinasas y fosfatasas actúan sobre proteínas específicas cuya actividad biológica experimenta cambios como consecuencia de la modificación estructural producida por estas enzimas. El ejemplo característico de esto lo constituye la modificación de una actividad enzimática como consecuencia de la fosforilación o desfosforilación. En otros casos la transducción de la señal modifica la actividad de factores de transcripción, por lo tanto el estímulo externo promueve cambios en la actividad génica.

Las respuestas desencadenadas por las señales extracelulares incluyen la regulación de la expresión genética, la regulación de una vía metabólica, o la locomoción celular por medio de cambios en el citoesqueleto. La activación de genes provoca la expresión de diferentes proteínas, desde proteínas reguladoras de la actividad metabólica hasta factores de transcripción. Debido a que los cambios en la actividad o expresión de factores de

transcripción pueden activar aún más genes, un estímulo inicial puede activar a través de la transducción de señales, la expresión de una gama entera de genes y una gran diversidad de eventos fisiológicos.

En este trabajo de Tesis se analizaron aspectos del mecanismo de acción de las hormonas LH y ACTH, por lo cual en esta introducción se describirán algunas moléculas involucradas en los mecanismos de transducción de señales desencadenados por acción de hormonas en general, pero con particular énfasis en aquellas que participan en la acción de las hormonas antes mencionadas.

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 son de naturaleza liposolubles y esto les confiere la capacidad de difundir a través de las membranas e interactuar con receptores intracelulares, como es el caso de las hormonas tiroideas. Sin embargo, la gran mayoría de las hormonas son de naturaleza proteica, que por su hidrofiliidad y tamaño no pueden atravesar libremente las membranas celulares. Estas moléculas se unen a receptores ubicados en la superficie de las células. Las hormonas esteroides son un caso particular, ya que pese a ser pequeñas y de naturaleza liposoluble, presentan receptores de ambos tipos: de membrana e intracelulares [6].

Como se comentó anteriormente, los receptores de membrana son estructuras que participan en la transmisión de la información desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Este flujo de información requiere la participación de otras moléculas altamente específicas, además de los receptores, cuya acción coordinada constituye lo que denominamos 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 tirosina quinasa del mismo, es por esto que llevan el nombre de receptores tirosina quinasa (RTKs) [7, 8]. La unión de sus ligandos desencadena la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina y dicha modificación promueve la capacidad del mismo de catalizar la fosforilación en tirosina de otros sustratos necesarios para transmitir la información al núcleo [9].

Existe otra 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 (*Trans-Membrane Segments*). Estos receptores presentan el extremo amino en el espacio extracelular y el extremo carboxilo en el espacio citoplasmático [10] y están asociados a un tipo particular de proteínas denominadas proteínas G, de las que se hablará a continuación.

Ambos tipos de receptores desempeñan un papel crucial en el control de procesos celulares básicos como la proliferación, la migración, el metabolismo, la diferenciación y la supervivencia celular. Como se describirá a continuación, gran parte de los ligandos que se unen a receptores de membrana del tipo 7TMS o RTKs 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 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: α , β y γ . La caracterización de estas subunidades muestra la existencia de un amplio número de isoformas que han sido agrupadas en cuatro familias: α_s , α_i , α_q , α_{12} [11]. La unión de la hormona al receptor promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G y la disociación de la subunidad α -GTP del

dímero $\beta\gamma$. A continuación, α -GTP y el dímero $\beta\gamma$ inician las respuestas intracelulares activando una variedad de moléculas efectoras. El papel funcional de las subunidades α , ampliamente descrito, incluye la activación de diferentes moléculas efectoras tales como enzimas, canales iónicos, transportadores de iones, etc. [12]. 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 proteínas quinasas que se conoce con el nombre de quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPKs) [13].

Algunas de las enzimas cuya actividad se altera como resultado del acople entre el receptor y la correspondiente subunidad α -GTP son fosfolipasas, fosfodiesterasas y adenilil ciclasas, entre otras. La activación de estas enzimas promueve un aumento en la concentración intracelular de pequeñas moléculas que amplifican 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 (IP3), diacilglicerol (DAG), Ca^{2+} y GMPc. Por ejemplo, el IP3 es un mensajero soluble que se une a receptores específicos en la membrana del retículo endoplásmico y esta unión provoca la salida de Ca^{2+} de esta organela. Por otro lado el DAG es un mensajero que permanece anclado a la membrana plasmática, en donde activa a la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos (*Protein Kinase Calcium-dependent*, PKC), proteína que posteriormente participará en el proceso de señalización hacia el interior de la célula.

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 incluso puede involucrar un cambio en la expresión de genes. Sin embargo, el grado de fosforilación de las proteínas no

depende exclusivamente de la actividad de proteínas quinasas. Más bien depende del balance neto de las actividades de proteínas quinasas y proteínas fosfatasa. Por lo tanto ambos tipos de enzimas, quinasas y fosfatasa, son igualmente importantes para la señalización intracelular. A continuación se describirán aspectos relacionados con estos dos tipos de moléculas: proteínas quinasas y proteínas fosfatasa.

I.4. PROTEÍNAS QUINASAS

La fosforilación de proteínas en residuos de serina, treonina o tirosina ha surgido como una modificación post-traducciona de importancia crítica en el control de las actividades de la célula. Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato en posición γ 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: proteínas tirosina quinasas o proteínas serina/treonina quinasas.

I.4.1. Proteínas Tirosina Quinasas

Este grupo de quinasas incluye algunas quinasas de localización intracelular como por ejemplo las quinasas JAKs (*Janus Tyrosine Kinase*), que se encuentran asociadas a receptores de tipo tirosina quinasa y cuya actividad se requiere para la fosforilación de las proteínas STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) [14] y las quinasas de la familia Src cuyos sustratos son fundamentalmente proteínas del citoesqueleto o moléculas de adhesión [15].

Sin embargo, el grupo más ampliamente caracterizado de tirosina quinasas es el conformado por los RTKs mencionados anteriormente. Estos receptores son los mediadores de la acción de diversos factores de crecimiento [16]. La unión del ligando a su RTK produce, en algunos casos a través de la dimerización del receptor [7, 17], la fosforilación en tirosina de múltiples sitios ubicados en la porción citoplasmática del receptor. La fosforilación de estos sitios es importante porque allí se generan sitios de anclaje para las moléculas blanco [18, 19]. Dichas moléculas son capaces de unirse a los

residuos fosforilados en tirosina a través de sus dominios SH2 (*Scr Homology region*). Este reclutamiento de diferentes moléculas facilita la interacción entre las mismas. Además, un RTK activado puede desencadenar la activación de sus moléculas blanco mediante la fosforilación en tirosina de las mismas. Por ejemplo el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento plaquetario promueven la fosforilación de los factores de transcripción STAT a través de la activación de sus receptores RTK [20, 21].

I.4.2. Proteínas Serina/Treonina Quinasas

Este grupo de quinasas incluye tanto receptores con actividad serina/treonina quinasa como quinasas intracelulares (citoplasmáticas, nucleares, etc).

El receptor del factor de crecimiento tumoral (*Tumoral Growth Factor Beta*, TGF- β) es un ejemplo de receptor con actividad de serina/treonina quinasa. Este receptor está compuesto por dos tipos diferentes de subunidades, TBR1 (o ALK5) y TBR2, que actúan como subunidades diméricas formando un complejo tetramérico. Frente a la interacción con su ligando, el dímero TBR2 fosforila y activa al dímero ALK5 y es una de estas subunidades la que fosforila en serina/treonina diversos sustratos, entre ellas proteínas Smads. Las proteínas Smads una vez activadas translocan al núcleo y promueven la transcripción de diversos genes [22].

La proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos (*Protein Kinase Calcium-dependent*, PKC), la proteína quinasa dependiente de AMPc (*Protein Kinase cAMP-dependent*, PKA) y las MAPKs ya mencionadas son ejemplos de serina/treonina quinasas citoplasmáticas. La actividad de estas quinasas puede ser regulada por eventos específicos (daño al ADN, estrés oxidativo, radiación UV) o por numerosas señales químicas que incluyen AMPc, GMPc, DAG, y Ca^{2+} /calmodulina, entre otros.

A continuación se describirán características bioquímicas de las quinasas más relevantes en el contexto de este trabajo de Tesis, la quinasa PKA y las MAPKs ERK1/2 debido a que estas enzimas son fundamentales en el mecanismo de acción de las hormonas esteroideogénicas.

I.4.2.a. Proteína Quinasa dependiente de AMPc

La proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) constituye un mediador central en la señalización intracelular por su capacidad de regular procesos celulares tales como la proliferación y la diferenciación [23], la organización de la red de microtúbulos [24], la condensación y descondensación de la cromatina y la exocitosis en diversos tipos celulares [25].

En el estado inactivo, PKA existe como un complejo tetramérico formado por 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 (RI α , RI β , RII α , RII β) y de las subunidades C (C α , C β , C γ) [26]. Estas subunidades se expresan diferencialmente en los distintos tejidos, y son capaces de integrar distintas isoformas de PKA. 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 compartimentos subcelulares para fosforilar diferentes sustratos según el estímulo [27]. Las AKAPs forman complejos multiproteicos con diferentes enzimas además de PKA, por ejemplo con sustratos de esta quinasa, fosfodiesterasas y fosfatasas, contribuyendo de esta forma no sólo a aumentar la especificidad y versatilidad de la transducción de señales, sino también a acotar espacio-temporalmente la actividad de PKA [28].

La PKA tiene un papel relevante en la transducción de señales involucradas en el control de diversos procesos celulares. En las siguientes secciones se describirá la

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

I.4.2.b. Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos

- Clasificación

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son una familia de serina/treonina quinasas que desempeñan un papel fundamental en la regulación de una amplia variedad de funciones celulares, que incluyen la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis. En los seres humanos, la superfamilia de MAPK incluye una decena de miembros, entre ellos ERK1, ERK2, ERK3, ERK5 y ERK7; JNK1, JNK2, JNK3 y las proteínas p38 MAPKs (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) [29-31]. Estas quinasas se clasifican en tres grandes grupos, según el tipo de estímulo que provoca su activación, entre otras características. Estos grupos están constituidos por: (a) las quinasas reguladas por señales extracelulares (*Extracellular Regulated Kinases*, ERKs), (b) 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 (c) el grupo de p38 [30].

La familia de las ERKs incluye dos enzimas denominadas ERK1 y ERK2 que exhiben una alta homología de secuencia, especialmente en el dominio de unión al sustrato [32]. 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 estímulos proliferativos en general [31, 33].

El grupo de las JNKs se activa en respuesta a múltiples formas de estrés ambiental y a citoquinas [34]. 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 [35].

Las MAPKs del grupo de p38, que incluye a las isoformas α , β , γ y δ , también se activan por exposición de las células a citoquinas [36], a distintos tipos de estrés ambiental [37], endotoxinas [38], hiperosmolaridad [39], pero no se activan 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 [31]. El sitio de fosforilación, ubicado en el dominio quinasa, consiste en un tripéptido con una secuencia general treonina-x-tirosina (thr-x-tyr). 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 [29, 30, 40].

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 o MKKKs). Un grupo de MAPKKKs está integrado por las quinasas Raf (α y β), las cuales acoplan la activación de las ERKs, vía MEK1 y MEK2, a una proteína que une GTP denominada Ras [41]. La activación de Ras ocurre vía RTKs y receptores 7TMS. 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) [30, 40].

La cascada de fosforilaciones que lleva a la activación de las MAPKs es facilitada por interacciones con proteínas adaptadoras o de anclaje (*scaffold proteins*). Estas proteínas organizan los caminos de señalización permitiendo el contacto simultáneo de varios componentes, determinando no sólo la localización subcelular sino también la duración de la actividad de las MAPKs, garantizando entonces la activación de una vía de señalización específica frente a un estímulo determinado.

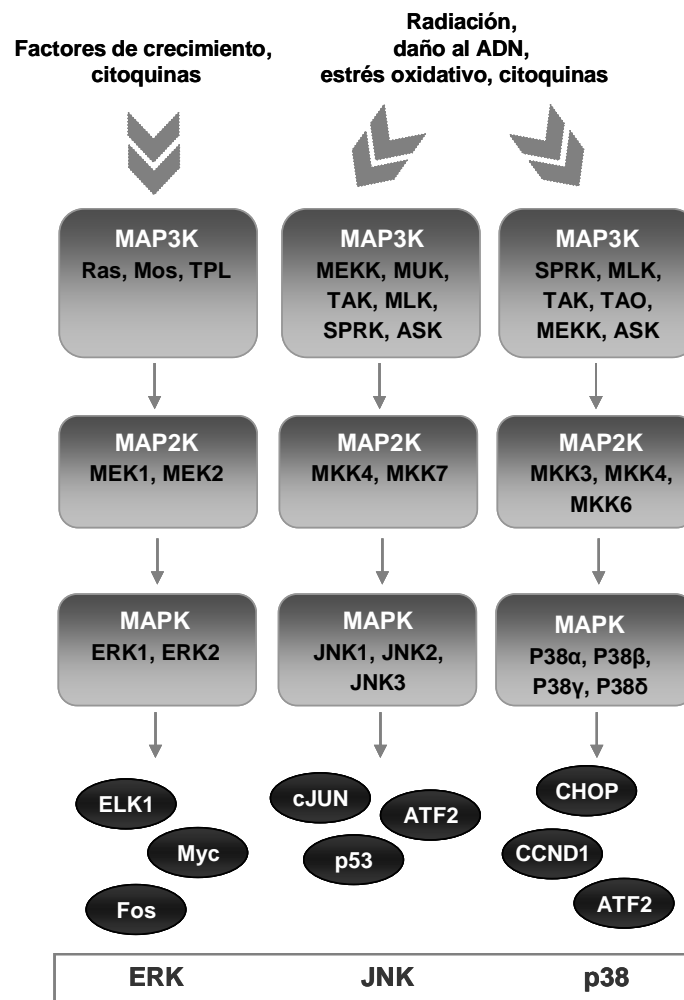


Figura 1. Esquema de las cascadas de activación de los tres principales grupos de MAP quinasas, ERK, JNK y p38. La activación de las MAPKs incluye la fosforilación y activación secuencial de distintas proteínas por acción de diferentes quinasas específicas: las MAP quinasas quinasas quinasas (MAPKKKs o MAP3K) y las MAP quinasas quinasas (MAPKKs o MAP2K). Los estímulos desencadenan la activación del primer miembro de la cascada: MAPK3.

Ejemplos de proteínas adaptadoras para el grupo de las MAP quinasas ERKs son KSR (*Kinase Suppressor of Ras*) y MP1 (*MEK Partner 1*). KSR interactúa con las proteínas Raf, MEK y ERK, facilitando la formación de un complejo entre estas proteínas y favoreciendo entonces la activación de ERK [42, 43]. De similar manera la proteína MP1 promueve la asociación de ERK a MEK [44]. Se ha visto que la disminución en los niveles de estas proteínas de anclaje mediante ARN pequeño de interferencia resulta en una

disminución de la activación de ERK en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento [45]. El grupo de las JNKs también tiene proteínas adaptadoras como las proteínas JIPs (*JNK Interacting Proteins*) y Axin que promueven la asociación de JNK con su quinasa activadora MKK7 [31]. OSM (*Osmosensing Scaffold for MEKK3*) es una de las pocas proteínas adaptadoras descritas para el grupo de las MAP quinases p38, sin embargo se ha demostrado que algunos miembros de la familia de las JIPs se asocian también a quinases de este grupo [46, 47].

El control de la magnitud y duración de la actividad de las MAPKs y por lo tanto del resultado de la señalización, depende también de la regulación de su estado de fosforilación por proteínas fosfatasas. La desfosforilación tanto del residuo treonina como del residuo tirosina del dominio catalítico de las MAPKs (motivo thr-x-tyr) resulta en la inhibición de su actividad enzimática. Las proteínas fosfatasas involucradas en este proceso pueden ser clasificadas en tres grupos, dependiendo del residuo fosforilado sobre el que actúan: proteínas (1) tirosina fosfatasas, (2) serina/treonina fosfatasas y (3) de especificidad dual (treonina y tirosina).

Entre las fosfatasas de serina/treonina que son capaces de desfosforilar a las MAPKs se ha descrito a las proteínas 2A y 2C (PP2A y PP2C) [48]. Entre las fosfatasas de tirosina 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 [49]. Sin embargo, un grupo particular de proteínas 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*, MKPs) y exhiben actividad dual (treonina y tirosina). Este grupo será ampliamente descrito en las próximas secciones.

- Sustratos 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 como Elk-1, c-Fos, c-Jun, STAT3, estas quinases también fosforilan enzimas citoplasmáticas, como ciertas fosfolipasas y proteínas

del citoesqueleto y proteínas de membrana como calnexina [30]. Más aún, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio se describe la fosforilación mediada por ERK1/2 en la mitocondria de una proteína esencial para la estimulación hormonal de la esteroidogénesis, la proteína StAR [50].

Otros sustratos de las MAPKs son las proteínas quinasas activadas por MAPKs (*MAPK-Activated Protein Kinases*, MAPKAPK), como RSK (*Ribosomal S Kinase*) y MSK (*Mitogen and Stress activated kinase*), 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 [30].

- Sitios de anclaje a las MAPKs

Las MAPKs se unen a sus proteínas regulatorias y sus sustratos a través de interacciones específicas proteína-proteína en sitios determinados denominados sitios de anclaje. Estos sitios están ubicados fuera del dominio catalítico de la enzima y son fundamentales en la determinación de la especificidad de sustrato, localización subcelular y eficiencia de la actividad enzimática [40].

Existen dos sitios de anclaje bien caracterizados en los sustratos de las MAPKs por los cuales las MAPKs se unen a los mismos, uno es el dominio de unión a MAPK (*MAP Kinase Binding domain*, MKB) y el otro es el dominio de anclaje a ERK (*Docking site for ERK*, DEF). El primero contiene una secuencia de aminoácidos cargados positivamente (arg/lys-x-x-arg/lys-x1-6-leu-x-leu) rodeados por una región hidrofóbica, que se encuentran frecuentemente ubicados hacia el extremo N o C-terminal de los sitios consenso de fosforilación (residuos serina o treonina seguido de una prolina, o secuencias PX(S/T)P). Mientras que en las MAPKs estas secuencias resultan ser complementarias presentando residuos con carga negativa y una región hidrofóbica [40, 51]. Esta secuencia está presente no sólo en los sustratos de ERK sino que también se la encuentra en sus proteínas regulatorias, como las MAPKKs, las fosfatasa STEP, PTP-SL y MKPs, entre otras [52, 53]. El otro dominio de anclaje, el dominio DEF (o motivo FxFP) está constituido por los aminoácidos phe-x-phe-pro. Este sitio ha sido descrito como de reconocimiento exclusivo por ERK y comúnmente se ubica en el extremo C-terminal de los sitios consenso de fosforilación [54, 55].

I.5. PROTEÍNAS FOSFATASAS

La fosforilación de proteínas es un evento de suma importancia en la regulación de las actividades de la célula. Una de las principales características de esta modificación es que, en el contexto celular, puede revertirse por acción de enzimas específicas: proteínas fosfatasas. Las proteínas fosfatasas son enzimas que remueven hidrolíticamente residuos fosfato específicos de las proteínas modificadas. En las células existe un balance dinámico entre la fosforilación y desfosforilación de proteínas por la acción concertada de proteínas quinasas y fosfatasas. Una modificación de cualquiera de estos componentes es probable que tenga un impacto importante en la transducción de señales. Actualmente se acepta que las proteínas fosfatasas cumplen funciones en la regulación de la actividad celular de similar relevancia que las proteínas quinasas.

I.5.1. Proteínas Serina/Treonina Fosfatasas

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 serina y treonina de sus proteínas blanco. Las PSTPs catalizan, en gran parte, la desfosforilación de proteínas involucradas en procesos metabólicos.

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 [56, 57]. Las isoformas PP1, PP2A, PP2B y PP2C son las responsables de casi toda la actividad de serina/treonina fosfatasa *in vivo* [58].

PP1 controla funciones tales como el metabolismo del glucógeno [59], la progresión del ciclo celular [60] y diversas actividades neuronales [61], 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 [62].

La proteína PP2A está formada por al menos 15 subunidades regulatorias y está involucrada en procesos tales como el ciclo celular [63] y el control de la actividad de telomerasa [64], entre otros.

La fosfatasa PP2B se caracteriza por su dependencia de Ca^{2+} y juega un rol crucial en la señalización a través de Ca^{2+} en células T activadas [65].

Los procesos de fosfo/desfosforilación constituyen uno de los mecanismos involucrados en la regulación de PSTPs. La fosforilación en residuos de tirosina influye en la actividad de estas enzimas. Se ha demostrado que PP2A es fosforilada *in vitro* en residuos de tirosina por acción de diferentes tirosina quinasas [66]. Este mismo proceso se ha observado en células intactas ante el tratamiento con diferentes agonistas que activan receptores con actividad de tirosina quinasa [66, 67] 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 [68]. Los efectos de esta modificación sobre la actividad de la enzima son variables y parecen depender tanto del estímulo como del tipo celular analizado.

I.5.2. Proteínas Tirosina Fosfatasas

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 [69-71]. 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 [72].

La familia de las proteínas tirosina fosfatasas comprende un grupo de enzimas que desfosforilan únicamente residuos de tirosina, llamadas proteínas PTPs “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 proteínas fosfatasas de actividad dual (*Dual Specificity Phosphatases*, DSPs) [73,

74]. Aunque pertenecen a la misma familia, estos dos grupos de enzimas presentan poca homología de secuencia excepto en los residuos claves dentro del sitio catalítico.

I.5.2.a. Proteínas PTPs “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 compartimentos intracelulares tales como el citoplasma 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 [70]. 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 [70]. El dominio no catalítico podría tener un rol en la localización subcelular de estas PTPs, dirigiéndolas a los compartimentos celulares específicos donde la concentración efectiva de sustrato es alta.

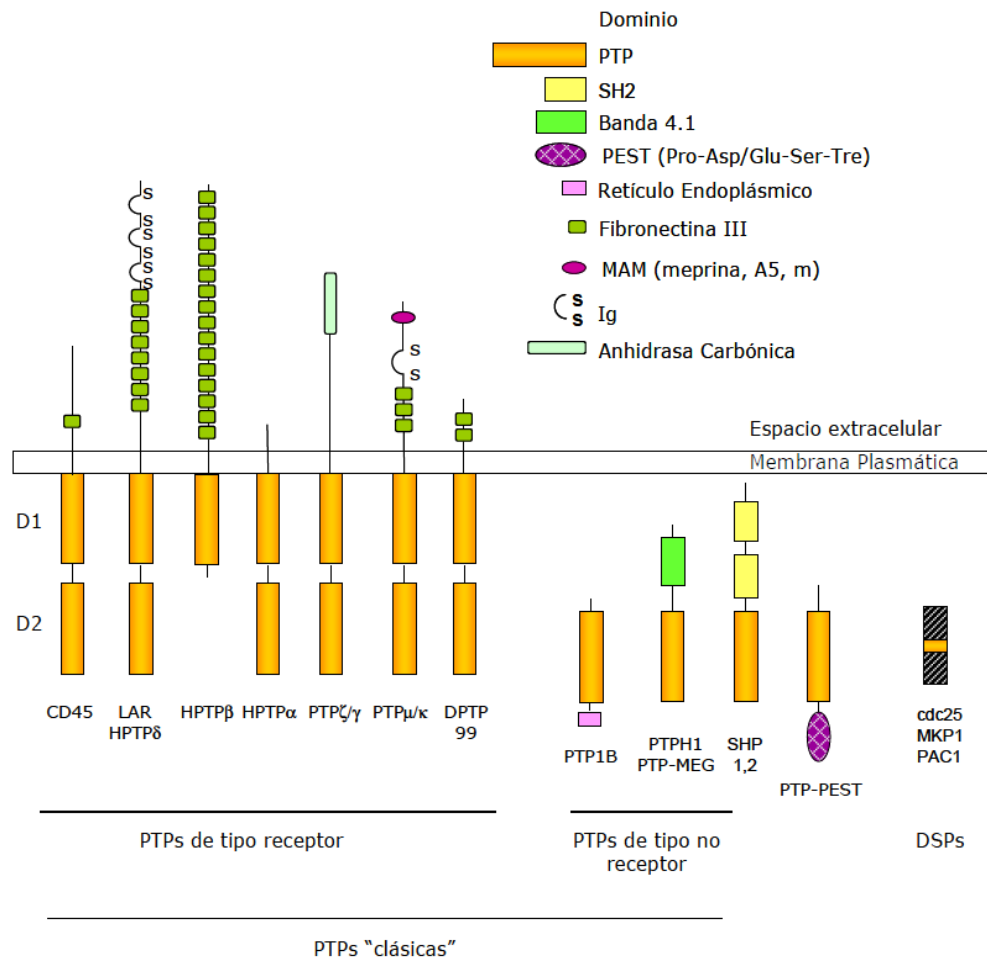


Figura 2. Clasificación y estructura de proteínas con actividad de tirosina fosfatasa.
 Extraído de: Protein tyrosine phosphatases in signaling. Streuli y col. 1996 [75].

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 de estas enzimas con proteínas fosforiladas en tirosina. 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 [70, 71].

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.

Con respecto a los mecanismos post-traduccionales de regulación, es bien conocido que la actividad de varias PTPs 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 [70, 71]. 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 [76, 77].

Por ejemplo, la insulina a través de la activación de su receptor fosforila a dos fosfatasas citosólicas: PTP1B [78] y PTP1C [79], incrementando así su actividad. La activación de estas PTPs por fosforilación permite regular negativamente la acción de la insulina [80, 81]. 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. Está descrito que PKA y PKC fosforilan a PTP1B *in vitro* en varios residuos de serina y que esta modificación reduce la actividad enzimática [82, 83]. Otra tirosina fosfatasa que se regula por fosforilación es PTP1D. En este caso se ha documentado la fosforilación tanto en residuos de serina/treonina como de tirosina [84, 85]. Nuestro grupo ha demostrado en células adrenocorticales de rata la expresión de PTP1D, la cual se activa por fosforilación dependiente de PKA en respuesta al estímulo hormonal (Tesis Doctoral 2008, Dra. Alejandra Gorostizaga, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

La actividad enzimática de las PTPs también es susceptible de regulación por oxidación del grupo tiol de la cisteína del sitio activo, un aminoácido 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 [86].

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. Se ha visto que muchas de estas proteínas forman dímeros y que esta dimerización puede también bloquear la actividad catalítica de estas enzimas [87].

I.5.2.b. Proteínas Fosfatasas de Actividad Dual

- Clasificación

Las proteínas fosfatasas de actividad dual (DSPs) son enzimas capaces de desfosforilar tanto residuos de tirosina como residuos de treonina. Esta familia está compuesta por varios subgrupos de enzimas, 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 [73].

En mamíferos se han identificado y caracterizado varios miembros de la familia de las MKPs y basándose en homología de secuencia, estructura proteica, especificidad por sustrato y localización subcelular, se los clasifica en tres grandes grupos: el primero, tipificado por MKP-1, comprende enzimas nucleares rápidamente inducibles por factores de crecimiento o señales de estrés [88, 89]. Incluye también a MKP-2, PAC-1 y hVH3. Estas enzimas están conformadas por 300 a 400 aminoácidos, no presentan secuencias de localización nuclear clásicas (NLS) pero sí presentan un motivo leu-x-x-leu-leu (o motivo LXXLL) en el extremo N-terminal. Este motivo está involucrado en la interacción con receptores nucleares y por lo tanto en el transporte al núcleo [90, 91]. El segundo subgrupo, tipificado por MKP-3, incluye predominantemente enzimas citosólicas, debido a que presentan secuencias de exportación nuclear (NES), y cuyos transcriptos son inducidos por estímulos específicos, pero no por estrés ambiental [92, 93]. El tercer grupo incluye a MKP-5 y MKP-7. Estas proteínas son más grandes que las de los otros subgrupos y se caracterizan porque desfosforilan selectivamente a las MAPKs JNK y p38 pero no a las ERKs. Tienen secuencias NES y NLS y se las encuentra tanto en citoplasma como en núcleo [94].

Es importante destacar que la clasificación de estas fosfatasa 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 [95].

- 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 (*Dual Specificity Phosphatase*, DSP) que se encuentra en el extremo C-terminal y el sitio de unión a las MAPKs (*MAP Kinase Binding domain*, MKB) que se encuentra ubicado en la porción N-terminal.

Con respecto al DSP 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-x-x-gly-x-x-arg-ser) involucrada en la catálisis [73].

El dominio MKB de las MKPs contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente, incluidos dentro de una región hidrofóbica, responsables de la interacción con las MAPKs [52, 53] (Figura 3). 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. Más aún, se ha demostrado que varias MKPs son activadas por la unión al sustrato a través de su dominio MKB [96, 97]. La unión de la MAPK fosforilada al dominio MKB altera la estructura del dominio DSP, este cambio conformacional junto con la interacción del dominio catalítico con la MAPK, causa un incremento en la actividad catalítica de MKP-3 [98].

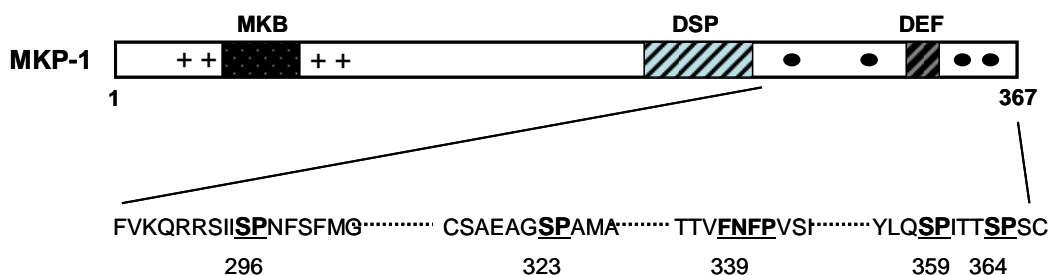


Figura 3. Dominios estructurales de la proteína MKP-1 humana y sitios de fosforilación. La MKP-1 humana tiene un dominio DEF (*Docking site for ERK*) o motivo FxFP que se encuentra entre los residuos 339-342, rodeado de 4 sitios consenso de fosforilación por ERK (residuos serina o treonina seguido de una prolina, o secuencias SP): Serina 296, 323, 359, y 364 (*círculos negros*). También se muestran los dominios MKB (*MAP Kinase Binding domain*) y el dominio catalítico DSP (*Dual Specificity Phosphatase*). Tomado de Lin y col, 2005 [99].

- Regulación transcripcional y post-traduccional 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 estímulos, tales como EGF [100] ácido araquidónico [101], estrés [102], glucagon [103] y glucocorticoides [104], entre otros. La fosfatasa PAC-1 es inducida por mitógenos en células B y T humanas [89]. MKP-2 es inducida por factores de crecimiento [105] y ácido retinoico [106].

Dependiendo del tipo celular, el mecanismo de inducción de las MKPs involucra la actividad de varias quinasas, entre ellas podemos mencionar a PKA y las MAPKs. Esto se condice con la presencia de sitios CRE (*cAMP response elements*) y sitios AP-1 (*Activator Protein 1*) en los promotores de los genes de las MKPs. En nuestro laboratorio se ha demostrado la participación de PKA en la inducción de MKP-1 por ACTH en células adrenocorticales [107]; en estas células la preincubación con un inhibidor de PKA bloquea en gran medida el incremento en los niveles del ARNm de MKP-1 alcanzados por el estímulo hormonal. También se ha visto en fibroblastos de ratón, que la activación de un miembro de la cascada de las MAPKs, Raf-1, además de activar a ERK1/2 promueve la inducción de MKP-1 y MKP-2. Más aún, la presencia del compuesto PD98059, un inhibidor de MEK1/2, disminuye notablemente los niveles de estas fosfatasas demostrando fehacientemente la participación de ERK1/2 en este proceso [108, 109]. Además de los

sitios AP-1 y CRE, el promotor de MKP-1 contiene sitios GRE (*glucocorticoid response elements*) y se ha demostrado efectivamente la inducción del gen por acción de glucocorticoides [110].

En cuanto a las MKPs citoplasmáticas un ejemplo lo constituye la isoforma MKP-3, una enzima que se expresa constitutivamente en algunos tipos celulares y en otros es inducible por factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico y el factor de crecimiento neuronal [111].

Existen diferencias entre las isoformas 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. Se postula que la diferente cinética de inducción de dos fosfatasa nucleares, MKP-1 y MKP-2 está relacionada con el control de la actividad de las MAPKs pero desde diferentes aspectos. Por un lado MKP-1 regularía la magnitud de la activación de las MAPKs, mientras que MKP-2, de expresión más tardía, regularía la duración de la actividad de estas quinasas [112].

Está documentado que algunos miembros de la familia de las MKPs también se regulan a nivel post-traducciona. Estudios realizados en fibroblastos de ratón han demostrado que la fosforilación de MKP-1 por ERK1/2 en la serinas 359 y 364 reduce el grado de ubiquitinación de MKP-1 promoviendo de esta forma su estabilización [108]. En contraposición a esto, existe un trabajo que demuestran que la activación de ERK1/2 induce la degradación de MKP-1, más aún, la presencia del PD98059, disminuye notablemente la ubiquitinación de esta fosfatasa [113]. Estas discrepancias se pueden explicar por los hallazgos recientes del grupo de Lin y Yang obtenidos en una línea celular humana. Este grupo demostró la existencia de otros sitios de fosforilación por ERK (Figura 3), distintos a los descritos por Brondello y colaboradores, los que están relacionados con la degradación de MKP-1 [99]. De estos trabajos podemos concluir que el efecto de la fosforilación de MKP-1 sobre su estabilización dependerá de cuál sea el residuo fosforilado y esto estará determinado tanto por el tipo celular como por el estímulo que lo desencadena. También se ha descrito la fosforilación de MKP-3 por acción de ERK1/2 y en este caso se observó que esta modificación promovería la degradación de la proteína [114].

Recientemente se analizó la acetilación de MKP-1 en una línea celular de monocitos de ratón, frente al estímulo con lipopolisacáridos (LPS). En este trabajo se demostró la acetilación de MKP-1 en una lisina 57 ubicada en el dominio de anclaje a MAPKs. La acetilación en este residuo incrementa notablemente la afinidad de MKP-1 por su sustrato p38 y esto conduce a una disminución en los niveles de p38 activada [115].

- Mecanismo de acción

Varias son las hipótesis acerca del mecanismo por el cual las MKPs llevan a cabo su función. Por un lado se propone que fosfatasas nucleares como MKP-1 y MKP-2, una vez que translocan al núcleo y su nivel de expresión aumenta, compiten con los sustratos de las MAPKs por la unión a éstas. Este evento serviría para atenuar la transcripción de genes dependiente de MAPK de dos formas: primero, desplazando la unión de la MAPK a sus sustratos, interfiriendo con la activación de éstos; segundo, por desfosforilación e inactivación de la MAPK. También las MKPs pueden unirse a MAPKs inactivas, y bloquear de esta forma cualquier posibilidad de activación posterior de la quinasa por un nuevo estímulo.

Otro mecanismo por el cual las MKPs pueden modular la actividad de MAPKs involucra la retención en un compartimento específico. Por ejemplo, se ha visto que ERK es retenida en el citoplasma por unión a MKP-3. Esta interacción evita la translocación de ERK al núcleo y consecuentemente la fosforilación de sus sustratos nucleares [116].

Por lo tanto las MKPs no solo regulan los procesos en los que participan las MAPKs por la directa inactivación de estas quinasas sino también por unión a ellas, impidiendo la interacción con otros reguladores y/o sustratos o secuestrándolas en determinados compartimentos celulares. Este mecanismo de inhibición de las MAPKs explicaría la existencia de las MKPs de la familia STYX. Estas MKPs son enzimas que contienen una mutación puntual en el dominio DSP que las hace catalíticamente inactivas [117] pero mantienen el dominio N-terminal característico de las MKPs, donde se encuentra el sitio de anclaje a MAPKs. Por lo tanto estas fosfatasas podrían regular también la actividad de las MAPKs por competencia con los sustratos de éstas.

- Función biológica

Como se comentó previamente, las MKPs actúan inactivando específicamente a las MAPKs. Por lo tanto las MKPs contribuyen a la regulación de procesos biológicos tan diversos como la proliferación celular, el desarrollo, la apoptosis, la diferenciación y la inflamación.

Se ha estudiado el rol de las MKPs en la regulación de la proliferación celular y apoptosis. Por ejemplo, la expresión de MKP-1 está aumentada en varios tipos de tumores humanos y se demostró que su sobre-expresión protege a estas células de la apoptosis mediada por distintos agentes antitumorales como el cisplatino [118], inhibidores del proteasoma [119] y radiación UV [120]. En células normales, también se observó el rol antiapoptótico de MKP-1 principalmente por su capacidad de inactivar las MAPKs, p38 y JNK. Sin embargo también se ha observado que esta fosfatasa puede inactivar otro miembro de la familia de MAPKs, ERK1/2 y esto resulta en la inhibición del ciclo celular. Estudios realizados utilizando fibroblastos provenientes de ratones *knock out* para el gen de MKP-1 mostraron una disminución de la velocidad de proliferación debida a un aumento de la muerte celular [121].

Estudios recientes han subrayado la importancia de MKP-1, MKP-5 y PAC-1 en la regulación de la inflamación durante la respuesta inmune innata. En macrófagos, la interacción de los receptores TLR (*Toll-like receptor*) con LPS en la membrana celular desencadena una respuesta inflamatoria que involucra la activación de dos vías intracelulares, la vía de NFκB y la vía de las MAPKs, fundamentalmente p38 y JNK. Es por esto que se ha estudiado intensamente el rol de las MKPs en la regulación de este proceso. Ratones *knock out* para los genes de MKP-1 y PAC-1 mostraron ser más susceptibles a las infecciones con LPS que los ratones *Wild type* [122]. Más aún, macrófagos derivados de estos animales mostraron aumentadas las actividades de p38 y JNK y, como consecuencia, niveles muy elevados de citoquinas proinflamatorias en respuesta a LPS [123].

II. SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES Y REGULACIÓN HORMONAL DEL PROCESO

Las hormonas esteroides derivan de un precursor común, el colesterol. De acuerdo a su acción biológica preponderante se clasifican en cinco grupos: progestágenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos. Estas hormonas regulan procesos diversos, como el metabolismo de glúcidos (glucocorticoides), balance hidrosalino (mineralocorticoides), la diferenciación sexual y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (andrógenos, estrógenos). La síntesis de hormonas esteroides es un proceso altamente regulado y ocurre en distintos tejidos como la glándula adrenal, gónadas, placenta y sistema nervioso central.

II.1. TEJIDOS PRODUCTORES DE HORMONAS ESTEROIDES

- Testículo

El testículo produce principalmente andrógenos. Este es un órgano encapsulado que 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 [124] (Figura 4). 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 [125]. Las hormonas hipofisarias folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), llamadas comúnmente gonadotropinas, son las principales reguladoras de la función testicular. La FSH, junto con los andrógenos, actúa sobre las células de Sertoli, en tanto que LH tiene su acción sobre las células de Leydig.

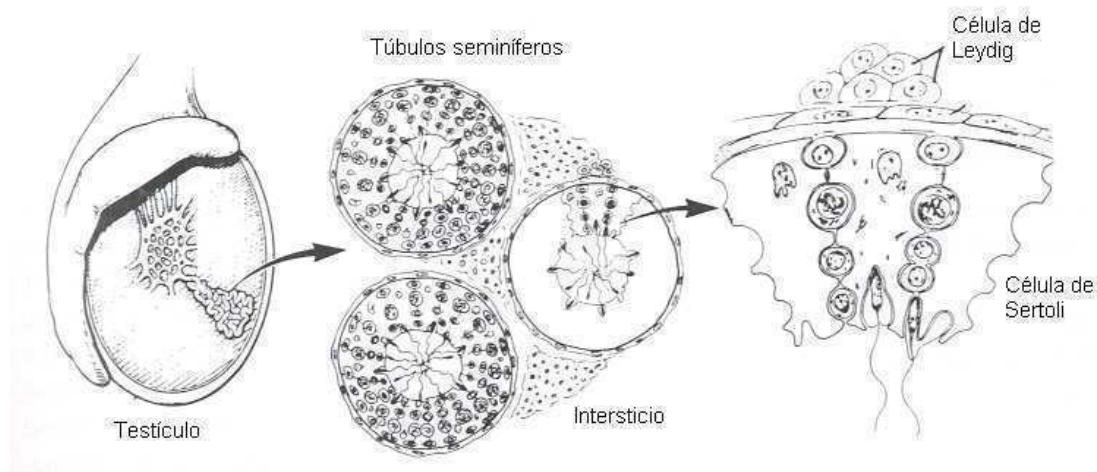


Figura 4: Organización celular del testículo de mamífero. En la derecha de la figura se muestran los eventos de la espermatogénesis y espermiogénesis en relación a tres células de Sertoli (Vertebrate Endocrinology, Norris David, 3ª edición).

- 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 5). 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.

El ACTH controla el crecimiento y la actividad endócrina de la corteza adrenal. Las hormonas esteroides de la glándula adrenal se sintetizan en la corteza. Los corticoides (u hormonas esteroides de la corteza adrenal) comprenden dos grupos de esteroides: los mineralocorticoides y los glucocorticoides. Las células de la ZG producen mineralocorticoides, principalmente aldosterona, en respuesta al K^+ extracelular, ACTH y angiotensina II [126-128]. Las ZF y ZR actúan como una unidad en lo que se refiere a biosíntesis de esteroides. En estas zonas se producen hormonas 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.

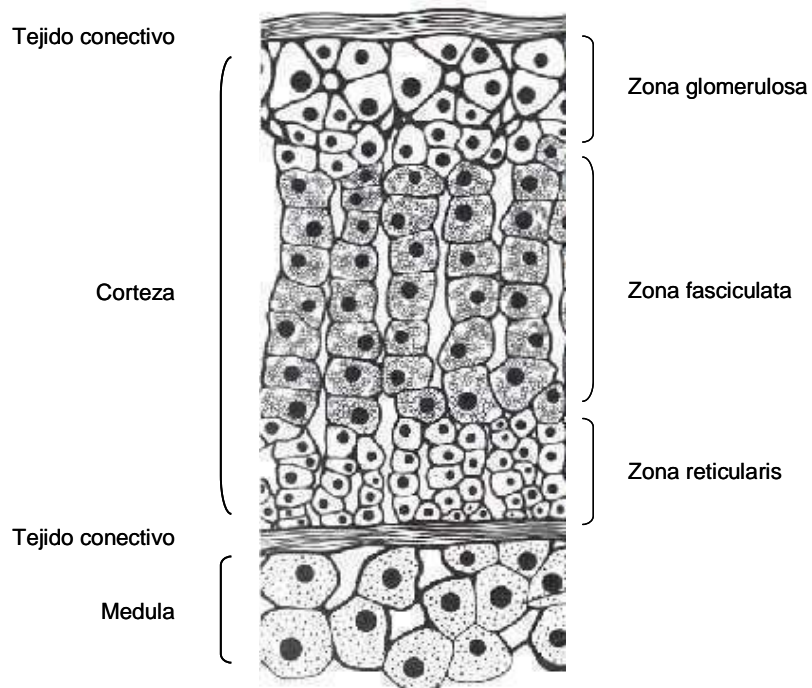


Figura 5. Representación esquemática de un corte histológico de la glándula adrenal. La glándula adrenal está constituida por una capa exterior de tejido conectivo, y tres zonas definidas: zona glomerulosa, zona fasciculata y zona reticularis. La médula adrenal está separada de la corteza por otra capa de tejido conectivo y está formada principalmente por células cromafines productoras de catecolaminas y opioides endógenos.

- Otros tejidos productores de esteroides

Otros tejidos productores de esteroides son el ovario y la placenta. Más recientemente se describió la síntesis de hormonas esteroides en el sistema nervioso central. Actualmente es ampliamente conocido que este tejido produce hormonas esteroides y que las mismas modulan procesos fisiológicos y patológicos de este tejido [129]. El colesterol utilizado en la neuroesteroidogénesis proviene de la síntesis local [130], ya que las lipoproteínas que transportan el colesterol no atraviesan la barrera hematoencefálica. El colesterol es transformado a pregnenolona, como en los tejidos esteroidogénicos clásicos, 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 [131].

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 hormona hipofisaria FSH. El principal esteroide producido por el folículo ovárico es el 17β -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.

II.2. BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

El colesterol es el precursor común de todas las hormonas esteroides en los vertebrados. La síntesis de hormonas esteroides depende del constante suplemento de colesterol que debe estar rápidamente disponible en la célula para ser transportado hacia la mitocondria donde se inicia la esteroidogénesis. El colesterol de los depósitos intracelulares puede provenir de la sangre, transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) o de baja densidad (LDL) dependiendo de la especie y el tipo celular [132, 133].

La otra fuente de colesterol, en menor proporción, es la síntesis celular *de novo* a partir de acetato. El colesterol es almacenado en forma de gotas lipídicas intracelulares esterificado con ácidos grasos.

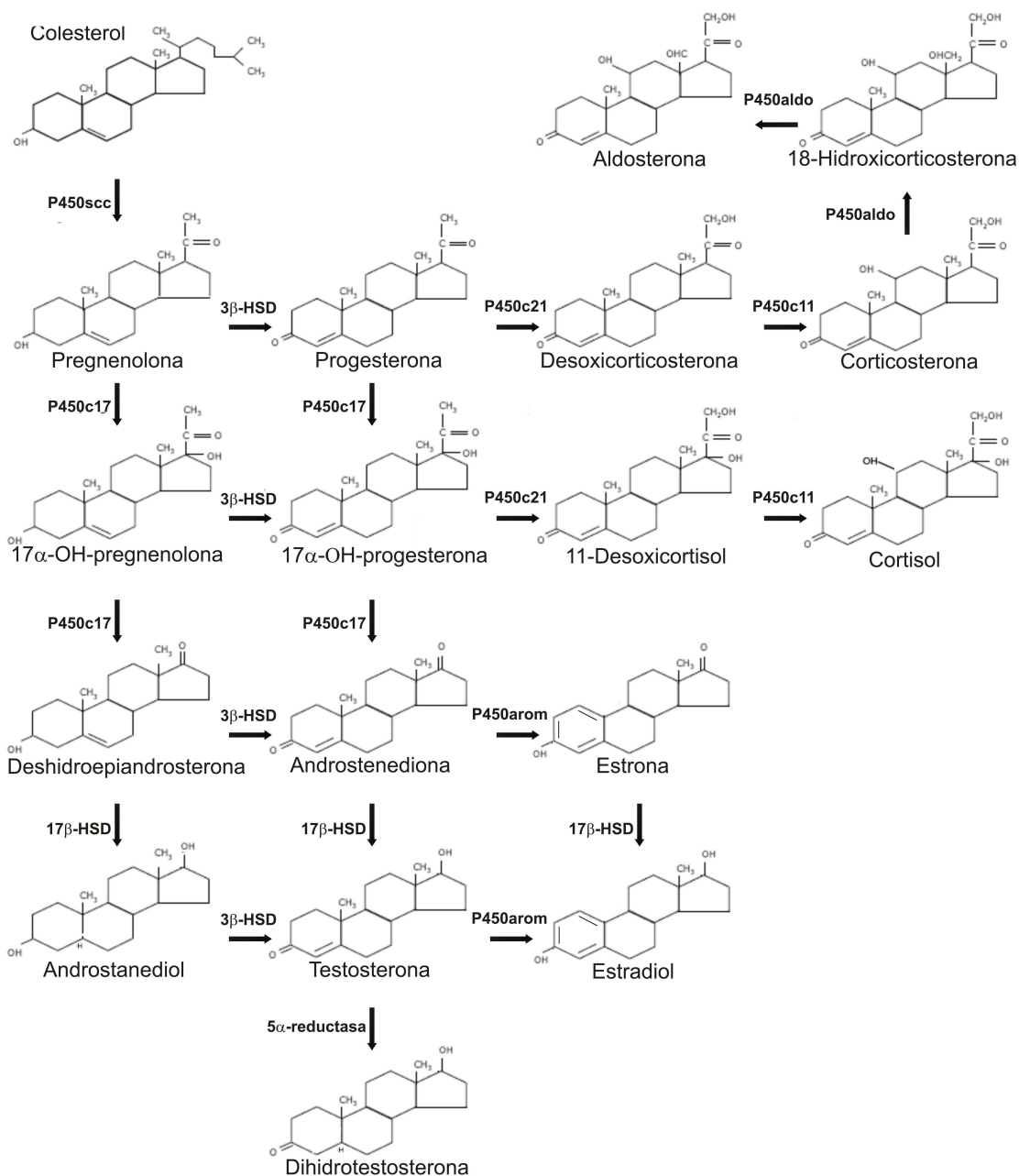


Figura 6: Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroideas. Referencias: P450scc: complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol; 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450c17: 17α-hidroxilasa/17,20-liasa; P450c21: 21-hidroxilasa; P450c11: 11β-hidroxilasa; P450aldo: aldosterona sintasa; P450arom: aromatasa; 17β-HSD: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

La primera etapa de la vía de síntesis de esteroideos consiste en la conversión de colesterol a pregnenolona (P5), un esteroide de 21 C, e isocaproaldehído [134] (Figura 6).

Esta reacción comprende dos hidroxilaciones sucesivas (en C-22 y C-20) y la escisión de la cadena lateral del colesterol. Esta reacción es catalizada por un complejo enzimático localizado en la membrana mitocondrial interna, denominado complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol (citocromo P450 *Side Chain Cleavage* o P450_{scc}) [135, 136].

La P5 es el precursor de todas las hormonas esteroides. Las reacciones que participan en la biosíntesis de esteroides ocurren en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático y requieren la acción de hidroxilasas, deshidrogenasas, y en ciertos pasos, una isomerasa y una liasa.

A partir de P5 se sintetiza 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 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD), enzima localizada en el retículo endoplasmático. También se detecta actividad de esta enzima en mitocondrias [137], fracción que constituye entre el 15 y el 40% de la actividad 3β -HSD celular total.

La expresión tisular diferencial de varias enzimas que convierten P5 y sus derivados determina el perfil de hormonas esteroides que libera cada tejido. 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. En la especie humana el principal glucocorticoide producido por las ZF y ZR de la corteza adrenal es el cortisol dado que predomina la actividad de la enzima que hidroxila a P5 en posición 17, mientras que en roedores se produce corticosterona por ser más importante la conversión directa de P5 en P4.

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 ZG, por lo tanto la producción de aldosterona se limita a esta zona. Otros esteroides

sintetizados en la corteza adrenal son los andrógenos, dehidroepiandrosterona, androstenediona y 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. La testosterona también es transformada a dihidrotestosterona en sus células blanco. La baja o nula actividad de 21-hidroxilasa en las células de Leydig le otorga a estas células su alta capacidad de síntesis de testosterona. La conversión de P5 y P4 en glucocorticoides y mineralocorticoides está significativamente disminuida por la deficiente hidroxilación en posición 21, determinando que los sustratos de esta enzima deriven en la formación de andrógenos.

II.3. HORMONAS ESTEROIDOGÉNICAS Y SU MECANISMO DE ACCIÓN

II.3.a. Hormonas Esteroidogénicas

En las células de la *pars distalis* de la adenohipófisis se sintetizan las hormonas LH, FSH y un grupo de hormonas que derivan de un precursor común, llamado proopiomelanocortina (POMC) [138]. El procesamiento del POMC genera las hormonas ACTH, α y β -melanocito estimulante (MSH), β -lipotrofina (LPH) y β -endorfinas. Las hormonas LH, FSH y ACTH son hormonas que promueven la esteroidogénesis en gónadas y corteza adrenal.

La LH y la FSH son glicoproteínas de 32 kDa constituídas por una subunidad α común a ambas, y una subunidad β característica de cada una [139]. Esta estructura es compartida también con otra hormona hipofisaria, la hormona tirotrófina (TSH). Aunque la subunidad β no tiene actividad por sí misma, la actividad biológica específica de estas hormonas está determinada por esta subunidad y para ello debe estar unida no

covalentemente a la subunidad α . LH estimula la producción de testosterona en las células de Leydig y la producción de progesterona por el cuerpo lúteo. La producción de estrógenos por el ovario está sostenida por FSH. En mamíferos, los ciclos menstruales, ovulación, mantenimiento de la gestación, parición y lactancia ocurren por la acción concertada de las hormonas LH, FSH y CG. Cuando las células de Leydig son el modelo de estudio se utiliza ampliamente la hormona gonadotrofina coriónica (CG) como estímulo. Esta tiene estructura similar a LH y tiene la propiedad de ser reconocida por el mismo receptor, por lo que puede actuar en células de Leydig estimulando la producción de andrógenos a través de la misma cascada de transducción de señales que LH.

El ACTH es un péptido de 39 aminoácidos que regula la producción de glucocorticoides en la ZF y en la ZR de la glándula adrenal y la producción de mineralocorticoides en la ZG. La angiotensina es un péptido que regula la síntesis de mineralocorticoides en la ZG.

II.3.b. Mecanismo de transducción de señales disparado por LH y ACTH

- Participación de PKA en el mecanismo de acción de LH y ACTH

LH y ACTH ejercen su acción mediante un mecanismo que se inicia con la unión a sus receptores de la membrana plasmática [4, 140]. 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 y consecuentemente, la fosforilación de proteínas regulatorias en residuos de serina/treonina [3, 4, 141, 142]. De esta manera se desencadena la respuesta celular específica: la síntesis y secreción de hormonas esteroides. La regulación aguda y crónica de la esteroidogénesis en células adrenocorticales y de Leydig por ACTH y LH respectivamente está básicamente mediada por proteínas fosforiladas por la acción de PKA, aunque estas hormonas también promueven la activación de otras proteínas quinasas.

Si bien es comúnmente aceptado que los efectos disparados por el receptor de LH son mediados fundamentalmente por PKA, otras vías de transducción de señales como las

activadas por PKC y Ca^{2+} /calmodulina quinasa (CaMK) también participan de este proceso [143, 144].

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 [145]. También se ha descrito que ACTH incrementa la actividad de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina en células adrenocorticales de rata [146]. Como se analizará en el punto siguiente, ACTH también dispara la activación de miembros de la familia de las MAP quinasas.

- Las MAPKs en el mecanismo de acción de LH y ACTH

El mecanismo de acción de LH involucra la activación de la quinasa 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 origen murino de la línea MA-10 [147]. 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 [148]. A diferencia de la activación de ERK1/2 por ACTH, este mecanismo es dependiente de PKA [148, 149].

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 las células adrenocorticales de origen murino de la línea Y1 [150]. Estas células, aunque de origen tumoral, se comportan como las células normales de la glándula adrenal de ratón en muchos aspectos, y están ampliamente aceptadas como modelo para el estudio de la regulación hormonal aguda de la esteroidogénesis adrenal. Estudios realizados en células Y1 permitieron demostrar que ACTH promueve la activación de varios miembros de la familia de las MAPKs. Se demostró que tanto en células Y1 como en la corteza adrenal de rata, la hormona ACTH promueve la activación de JNK a través de un mecanismo dependiente de PKC y de Ca^{2+} [151]. Los autores han postulado que esta activación estaría involucrada en la expresión de genes responsables de la respuesta celular a situaciones de estrés. Otros autores demostraron además que ACTH promueve la activación de ERK1/2, evento detectado a los pocos minutos de la estimulación hormonal

de células Y1 [152]. 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 [152].

En esta sección y la anterior se describió la acción de LH y ACTH sobre las quinasas PKA y ERK1/2. Dado que ambas hormonas promueven la esteroidogénesis, la pregunta que surge es cuál es el grado de participación de ambas quinasas en la activación de la esteroidogénesis. Un tema en particular ha sido tópico de intenso debate y ha promovido un gran número de investigaciones con el fin de conocer con exactitud cómo las hormonas esteroidogénicas promueven, mediante la fosforilación de proteínas, el incremento en la velocidad de síntesis de esteroides: cuál es la identidad del sustrato de esta(s) quinasa(s) activada(s) por acción hormonal y cómo se conecta éste y el proceso esteroidogénico. Algunos aspectos relacionados con estos temas se discuten en las secciones siguientes.

II.4. REGULACIÓN HORMONAL AGUDA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS

II.4.a. Papel de la síntesis proteica en la regulación hormonal de la esteroidogénesis

Con respecto a la acción de las hormonas LH y ACTH sobre la esteroidogénesis pueden diferenciarse temporalmente dos fases: aguda y crónica. La regulación aguda, sobre la cual nos referiremos a continuación, se extiende durante unos pocos minutos luego de iniciado el estímulo. La regulación crónica ocurre en un período más extenso, del orden de horas. Los efectos crónicos de LH y ACTH incluyen el incremento de la transcripción de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de esteroides [153], manteniendo así la capacidad esteroidogénica celular. En contraste con lo que ocurre en la fase crónica, en la fase aguda el nivel de enzimas esteroidogénicas permanece constante [154].

A diferencia de las hormonas proteicas que son almacenadas en vesículas secretorias, las hormonas esteroides no se almacenan en cantidades apreciables en las células esteroidogénicas. Es por ello que una respuesta esteroidogénica rápida o aguda requiere de la síntesis *de novo* de esteroides. Los efectos agudos de las hormonas ACTH y

LH se atribuyen principalmente a la fosforilación dependiente de PKA de proteínas regulatorias que afectan el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna. En la biosíntesis de esteroides la reacción que transcurre más lentamente es la que corresponde a la conversión de colesterol a pregnenolona, catalizada por el complejo enzimático P450scc [155]. Sin embargo, el efecto esteroideogénico agudo no está limitado por el mecanismo catalítico en sí sino por el acceso de colesterol al sitio activo del complejo P450scc. Más específicamente, el paso limitante y hormonalmente regulado de la esteroideogénesis es el transporte de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna [156] y éste ocurre en respuesta a la cascada de eventos de fosforilación desencadenada por las hormonas ACTH y LH en las células blanco respectivas. Esto se evidencia por el hecho de que los derivados solubles del colesterol, que atraviesan libremente las membranas mitocondriales, como el 22(R)-OH-colesterol, se metabolizan a pregnenolona en ausencia de estímulo hormonal [155-157] indicando que el complejo P450scc es completamente activo en ausencia del estímulo hormonal y que la disponibilidad de colesterol es el factor regulado hormonalmente.

Uno de los primeros y más importantes hallazgos en el estudio de la regulación aguda de la esteroideogénesis fue comprobar que la misma es dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas [158-160]. Se ha observado que el tratamiento con inhibidores de la síntesis proteica tales como la cicloheximida (CHX), previo al estímulo hormonal, evita el incremento de la velocidad de síntesis de esteroides que produce la hormona y no afecta el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial externa ni la actividad de P450scc, pero sí el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna [156].

A partir de los estudios descritos en el párrafo anterior surgió la hipótesis que propuso que un factor estimulado hormonalmente, rápidamente sintetizado, sensible a cicloheximida y lábil participa en la estimulación aguda de la síntesis de hormonas esteroides estimulando el transporte de colesterol hacia la membrana mitocondrial interna. La búsqueda de este factor dio como resultado la identificación de varias proteínas que tienen la capacidad de incrementar el transporte intramitocondrial de colesterol y que reúnen, en mayor o menor medida, los requisitos como para ser consideradas la proteína lábil necesaria para la regulación aguda de la esteroideogénesis. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la existencia de esta(s) proteína(s) no sería suficiente para explicar

el transporte de colesterol. La misma necesitaría de un canal específico y definido a través del cual se produzca el transporte [161-163]. Se ha demostrado la formación de sitios de contacto entre ambas membranas mitocondriales los cuales estarían constituidos por proteínas que forman un puente o posiblemente un túnel entre ambas membranas mediando, entre otras funciones, el transporte de colesterol [164].

II.4.b. Proteínas intermediarias en la regulación aguda de la esteroidogénesis

Los conocimientos acerca de la participación de una proteína regulada hormonalmente y de alto recambio en la regulación aguda de la esteroidogénesis promovieron una serie de estudios con el objetivo de identificar una o más proteínas con estas características. Dos de las proteínas descritas como intermediarios obligatorios, aunque no suficientes, en la acción de hormonas esteroidogénicas involucradas en el mecanismo de transporte de colesterol son el PBR (*Peripheral-type Benzodiazepine Receptor*), actualmente denominado TSPO (*Translocator Protein*) y la proteína StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*) [165].

- Receptor periférico de benzodiazepinas / Translocator protein

El receptor periférico de benzodiazepinas (*peripheral-type benzodiazepine receptor*, PBR) es una proteína de la membrana mitocondrial externa de expresión ubicua. Sin embargo en tejidos esteroidogénicos los niveles de expresión de esta proteína son muy superiores a los observados en el resto de los tejidos [166].

El PBR presenta un dominio conteniendo un sitio consenso de unión a colesterol, es abundante principalmente en células esteroidogénicas y es indispensable para la supervivencia [167]. Esta proteína, que une colesterol con alta afinidad, ha sido recientemente red denominada *Translocator Protein* (18 kDa) (TSPO) teniendo en cuenta su función prominente [168]. La TSPO es una proteína integral de la membrana mitocondrial externa donde está funcionalmente asociada a canales mitocondriales como los canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC, *voltage-dependent anion-selective channel*) y el transportador de nucleótidos de adenina (ANT, *adenine nucleotide transporter*) ubicado en

la membrana mitocondrial interna [167]. Asimismo se asocia con PKA y su proteína de anclaje en mitocondria (PAP7) [164].

Como hemos mencionado, el ligando endógeno de PBR/TSPO es el inhibidor de unión al diazepán (DBI). El DBI, al igual que el PBR, está presente en numerosos tejidos, pero se expresa en altas concentraciones en células esteroideogénicas [169]. El DBI y los agonistas de benzodiazepinas al unirse a PBR estimulan el transporte intramitocondrial de colesterol y la esteroideogénesis [170].

- **Proteína StAR**

Esta proteína fue descrita inicialmente como miembro de una familia de proteínas de peso molecular comprendido entre 30 y 37 kDa que se sintetizan en células adrenales en respuesta al estímulo hormonal agudo [3, 142]. Posteriormente se demostró que la proteína de 30 kDa proviene de un precursor de 37 kDa y que la misma es capaz de estimular la transferencia de colesterol a la mitocondria, por lo cual fue denominada StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) [171]. Actualmente se presume que el precursor de 37 kDa es la forma activa de la proteína [172], que por estimulación hormonal se fosforila por acción de PKA y experimenta clivaje proteolítico secuencial para generar la proteína madura de 30 kDa que se acumula en la matriz mitocondrial [171-173].

La evidencia más fuerte respecto del requerimiento de StAR en la síntesis de hormonas esteroideas es que mutaciones en el gen que codifica para la proteína StAR (STARD1) causan Hiperplasia Adrenal Lipóide Congénita [174, 175], una rara y severa patología humana. Los individuos afectados con esta patología tienen una deficiente o nula capacidad de sintetizar todos los esteroideas adrenales y gonadales. Este fenotipo es idéntico al del ratón *knock out* de StAR, lo que demuestra fehacientemente el rol de la proteína StAR en la esteroideogénesis [176].

II.5. REGULACIÓN HORMONAL DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE StAR

II.5.a. Regulación de la expresión de StAR

La expresión de StAR está finamente regulada hormonalmente [177, 178]. En particular las hormonas ACTH y LH promueven un incremento tanto de los niveles de su ARNm como de la síntesis y fosforilación de la proteína [50, 173, 179].

En células esteroideogénicas, tanto la estimulación hormonal aguda como el tratamiento con análogos del AMPc incrementan la síntesis *de novo* de la proteína StAR y la producción de esteroides, en una forma dependiente del tiempo y la concentración del estímulo. Se ha comprobado que las hormonas esteroideogénicas que actúan vía AMPc, *in vivo* incrementan los niveles del ARNm y proteína de StAR aproximadamente a los 15-30 minutos de estimulación, alcanzando un máximo a las 6 horas [180, 181]. Dado que diversos trabajos han demostrado que el aumento en los niveles de ARNm precede al incremento en los niveles proteicos [178, 182], se deduce que la transcripción del gen de StAR es uno de los principales eventos sobre los cuales AMPc/PKA ejerce su acción regulatoria.

Ciertos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 pueden estimular la síntesis de esteroides en células de Leydig a través del incremento de la expresión de StAR, sin afectar los niveles de AMPc [183, 184]. Al respecto se ha demostrado que la vía de PKC podría ser relevante en la inducción del gen de StAR y esteroideogénesis por factores de crecimiento [143].

Si bien la regulación de la expresión del gen STARD1 ha sido extensamente analizada, todavía no está completamente esclarecida la secuencia de eventos que desencadenan LH/ACTH para promover la activación de este gen e incrementar los niveles de la proteína StAR en la respuesta esteroideogénica aguda.

- Rol del ácido araquidónico en la regulación de StAR

El ácido araquidónico (AA) es otro regulador de la expresión de StAR. La liberación de AA constituye un proceso regulado por acción hormonal por un mecanismo que incluye

eventos de fosfo/desfosforilación. Los primeros estudios en este tema demostraron que la acción de LH y ACTH en sus respectivos tejidos blanco promueve un incremento en los niveles de AA el cual participa en la estimulación de la síntesis de esteroides [185-187]. Las investigaciones de nuestro grupo encaradas con el fin caracterizar el mecanismo de liberación de AA por acción de LH/ACTH condujeron a la descripción de una nueva vía de generación de AA intramitocondrial en células esteroideogénicas [188]. En esta vía intervienen dos proteínas: una acil-CoA sintetasa 4 (Acsl4) [189] y una acil-CoA tioesterasa mitocondrial (Acot2), purificada y caracterizada a nivel molecular en nuestro laboratorio [190, 191]. Acsl4 es una enzima que utiliza preferentemente AA como sustrato, para formar araquidonoil-CoA. El araquidonoil-CoA se une a una proteína ligadora de acil-CoA que la dirige a la mitocondria donde es sustrato de Acot2, una enzima que es regulada por fosforilación dependiente de PKA. La hidrólisis de araquidonoil-CoA rinde AA libre y coenzima A (CoA-SH).

El papel fundamental de las proteínas Acot2 y Acsl4 en la liberación de AA y la esteoideogénesis ha sido bien demostrado a través de experimentos en los que se bloquea la expresión de estas proteínas [192]. En concordancia con estos hallazgos posteriormente se determinó que el gen de StAR posee un elemento respondedor a AA que reside en la región -96/-67 de su promotor y se observó que los metabolitos lipoxigenados de AA inducen la transcripción del gen [193]. Por lo tanto se postula que el AA que se genera en la mitocondria por la acción concertada de Acsl4 y Acot2 ante el estímulo hormonal se metaboliza, posiblemente por lipoxigenasas mitocondriales, y los metabolitos se dirigen al núcleo donde promueven la inducción de StAR [194].

- *Secuencias antisentido naturales en la regulación de StAR*

La proteína StAR está codificada por un marco de lectura abierta de 852 pb repartidos en 7 exones [195, 196]. Se ha caracterizado ampliamente la regulación de su transcripción inducida por AMPc a través de elementos en la región 5' UTR (*untranslated region*) [196, 197]. Se ha demostrado que esta secuencia da origen a tres transcritos de distinto tamaño, que difieren en la longitud de la región 3' UTR [196, 198]. Recientemente se ha demostrado una regulación independiente de los diferentes transcritos de StAR [199], pero todavía no se conoce exactamente la función de los diferentes transcritos ni los

mecanismos que regulan su expresión.

Nuestro grupo de trabajo ha descrito un nuevo tipo de regulación de la transcripción de StAR. Esta regulación está mediada por transcritos antisentido naturales (*Natural Antisense Transcripts*, NATs). Tanto en células de Leydig MA-10 como en tejidos esteroideogénicos de ratón se detectó la expresión de un transcrito antisentido natural de StAR que es regulado hormonalmente. Más aún, la sobre-expresión de este NAT tiene un efecto diferencial sobre los transcritos de StAR y altera la expresión de la proteína StAR y la esteroideogénesis, lo que pone en evidencia la importancia de este NAT en la regulación de la síntesis de esteroides (Dra. Fernanda Castillo, Tesis Doctoral, 2009, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA).

- Factores de transcripción que participan en la expresión de StAR

En numerosos trabajos se ha abordado extensamente el estudio de la regulación transcripcional de StAR focalizando la atención en una variedad de factores de transcripción que están bien caracterizados como capaces de interactuar con el promotor correspondiente. Entre éstos se incluyen reguladores positivos, tales como SF-1 (*steroidogenic factor 1*, NR5A1), CREB/CREM (*cAMP response-element binding protein/CRE modulation protein*), SREBP (*sterol regulatory element binding protein*), NUR77 (*Nerve Growth Factor Induced β* , NR4A1), GATA-4, C/EBP β (*CCAAT/enhancer binding protein*), Sp1 y la familia de AP1 (*activator protein 1*), y reguladores negativos, como DAX-1 (*dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X-chromosome*) y YY1 (*ying and yang 1*) [197].

Se ha demostrado que los factores de transcripción mencionados se unen a la región proximal del promotor de StAR (250 nucleótidos anteriores al sitio de iniciación de la transcripción) y que juegan un rol crítico controlando la expresión de este gen. Más aún, se demostró que existe una cooperación/interacción funcional entre muchos de estos factores [197]. Si bien las hormonas que regulan la esteroideogénesis regulan la expresión de StAR mediante su acción a nivel de la inducción y/o actividad de estos factores, otro importante mecanismo regulatorio de la transcripción de StAR involucra la acetilación y metilación de las histonas unidas al promotor de StAR [200, 201]. Estas modificaciones de las histonas

influyen en la compactación de la cromatina, alterándola y permitiendo de esta forma la interacción con diversos factores de transcripción.

Dos de los factores de transcripción que participan en la expresión de StAR ya mencionados serán descritos con mayor detalle a continuación por su relevancia en el contexto de este trabajo.

SF-1 (NR5A1): es un miembro de la familia de receptores nucleares huérfanos que está presente en diversos tejidos endócrinos como la glándula adrenal y las gónadas [202]. El análisis de los ratones *knock out* para SF-1 reveló el rol esencial de este factor en el desarrollo de tejidos esteroideogénicos, por su acción sobre la inducción de genes que codifican para enzimas esteroideogénicas [203]. Se ha determinado la existencia de al menos 6 sitios de unión para SF-1 en el promotor de StAR, ubicados en las regiones -754, -483, -445, -132, -97 y -42 respecto del sitio de inicio de la transcripción. En células de Leydig MA-10 se ha demostrado un incremento significativo en la asociación del SF-1 al promotor de StAR a los 15 minutos del estímulo con AMPc. Pasado este tiempo esta asociación disminuye notablemente para ir aumentando nuevamente en forma gradual hasta alcanzar un máximo a las 2 horas que se mantiene luego de 4 horas de estimulación [200]. Este patrón de unión al promotor sugiere que el SF-1 participa tanto en la iniciación de la transcripción como en el mantenimiento de la misma a largo plazo. Debido a la expresión constitutiva de SF-1, aún en presencia de la hormona, se sugirió y luego demostró que los cambios temporales de asociación de SF-1 al promotor de StAR son el resultado de modificaciones post-traduccionales, más precisamente fosforilaciones [204, 205], las cuales modularían la asociación de este factor con proteínas (coactivadores o corepresores) que forman parte de la maquinaria de transcripción. En función de esto se ha analizado la presencia de sitios de fosforilación en la secuencia proteica de SF-1. El análisis de la secuencia ha mostrado la existencia de un posible sitio de fosforilación por ERK1/2. Posteriormente se corroboró efectivamente la fosforilación de SF-1 en serina 203 por ERK1/2 en respuesta al estímulo hormonal y se vio que esta modificación modula la actividad de SF-1 mediante la asociación a distintos cofactores [204, 205]. Se ha determinado que SF-1 fosforilado es menos susceptible a la acción de proteasas que en su estado desfosforilado, lo cual sugiere que la fosforilación del SF-1 induciría un cambio conformacional en su LBD (*ligand binding domain*) que promovería su compactación.

También se han observado otras modificaciones post-traduccionales sobre SF-1 que modulan su actividad, como la acetilación y la sumoilación [206, 207].

NUR77 (NR4A1): este factor de transcripción está presente en varios tejidos, incluyendo testículo, ovario, músculo, timo, glándula adrenal y en el sistema nervioso central. Al igual que SF-1, es también miembro de la familia de receptores nucleares huérfanos. Actualmente se sabe que es un importante regulador de la expresión génica en células esteroideogénicas, incluyendo células de Leydig [208, 209]. A diferencia de SF-1, NUR77 es un factor de transcripción clasificado como un gen de expresión temprana ya que se induce rápidamente por múltiples estímulos fisiológicos como Ca^{2+} , factores de crecimiento, prostaglandinas, neurotransmisores, hormonas [210-214]. Trabajos muy recientes han demostrado la inducción del gen de NUR77 en respuesta a LH/CG en células de Leydig [215, 216]. El mecanismo por el cual estas hormonas promueven la inducción, como también la activación por fosforilación, involucra una cascada de señales que en parte son desencadenadas por un aumento intracelular de Ca^{2+} . En ese mecanismo, la quinasa CaMKII tiene un papel relevante aunque no se descarta la participación de las MAPKs y de fosfatasa dependientes de Ca^{2+} , según lo que se observa para la inducción y activación de NUR77 en otros sistemas [210, 217].

- Rol de PKA y ERK1/2 en la inducción de StAR

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 esteroideogénesis. Se ha demostrado, mediante el uso de inhibidores específicos, que el bloqueo de la activación de ERK1/2 promovida por AMPc inhibe la esteroideogénesis y la inducción de StAR en células adrenocorticales Y1 y de Leydig MA-10 [218]. En este trabajo los autores demuestran que la actividad de ERK1/2 es necesaria para la fosforilación del factor de transcripción SF-1, el cual debe estar fosforilado para promover la transcripción del gen StAR.

Aunque en células de Leydig de la línea MA-10 se demostró que la cascada de ERK1/2 está involucrada en la expresión de StAR [218], la actividad de estas quinasas puede estimular o inhibir la expresión de StAR según el tipo de estímulo que origine su

activación. Por ejemplo la preincubación de las células con un inhibidor de ERK1/2, UO126, disminuye la expresión de StAR cuando el estímulo es PMA, pero la aumenta cuando el estímulo es AMPc/hCG [149]. Estos resultados contradictorios se atribuirían al hecho que la actividad de ERK1/2 modula en distinto grado dos eventos que producen efectos opuestos sobre la expresión de StAR: incrementa tanto la fosforilación y actividad de SF-1 como la expresión de DAX-1, un factor inhibitorio de la transcripción de StAR.

II.5.b. Regulación de la actividad de StAR

La proteína StAR fue descrita inicialmente como una fosfoproteína mitocondrial. En su secuencia se han identificado dos posibles sitios de fosforilación por PKA y uno por PKC. Mediante experimentos de mutación sitio dirigida se observó que la fosforilación de los residuos serina 56 y serina 194 son críticos para la actividad de esta proteína [219]. Su fosforilación por PKA es esencial y obligatoria para su activación y la producción de esteroides.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha descrito en la mitocondria un complejo multimérico de proteínas quinasas, que incluye a PKA, MEK1/2 y ERK1/2. En esta organela, la actividad de ERK1/2, que se incrementa por estimulación hormonal, es responsable de la fosforilación y activación de StAR [50]. Incluso se demostró en reacciones de fosforilación *in vitro* que ERK1/2 fosforila a StAR en serina 232 y que esta fosforilación es necesaria para la acción de StAR sobre el transporte de colesterol a la mitocondria [50].

En síntesis, se concluye que en células adrenocorticales y de Leydig las quinasas ERK1/2 participan en la activación de StAR mediante un mecanismo que involucra la fosforilación directa de esta proteína en la mitocondria. Además estas quinasas participan en la activación/inducción de varios factores de transcripción, como SF-1 y NUR77, necesarios para la inducción de STARD1.

III. PROTEÍNAS FOSFATASAS EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

LH y ACTH regulan tanto el trofismo 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. Para aquellos procesos regulados por LH/ACTH vía PKA no sólo será importante conocer acerca de las serina/treonina fosfatasas que intervienen en el balance del grado de fosforilación de las proteínas reguladas por acción hormonal, sino también estudiar las fosfatasas duales y las tirosina fosfatasas. Esta consideración se basa en el hecho de que la activación de serina/treonina quinasas como PKA y PKC puede desencadenar la expresión y modulación de la actividad de distintos tipos de fosfatasas [107].

III.1. REGULACIÓN DE PROTEÍNAS FOSFATASAS EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS POR LH/ACTH

III.1.a. Regulación de Proteínas Serina/Treonina Fosfatasas por LH/ACTH

Los primeros trabajos relacionados con las proteínas fosfatasas de células productoras de esteroides se focalizaron en la regulación de la serina/treonina fosfatasa PP1 en la corteza adrenal de rata. Se demostró que ACTH producía, en forma dependiente del tiempo y de la dosis, la fosforilación y activación del I1, un inhibidor de PP1 [220]. Estos resultados indicaban 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 [221]. Consistentemente con este hallazgo, Jones y col. demostraron que los inhibidores mencionados bloquean la inducción de la proteína StAR por AMPc [222].

En nuestro laboratorio se demostró la inhibición de serina/treonina fosfatasas por AMPc. Se comprobó que la actividad de PP2A es inhibida por AMPc en células de Leydig MA-10 [223]. Estos resultados y los de Sayed y col. resultan incompatibles. Dado que los inhibidores de serina/treonina fosfatasas inhiben la síntesis proteica, es posible que la inhibición de la síntesis de esteroides por estos compuestos se deba a este efecto.

En células adrenocorticales Y1 también se detectó que ACTH promueve la asociación de dos serina/treonina fosfatasas, PP1 y PP2A, al promotor del gen que codifica para el receptor de ACTH (Mc2r) [224]. El patrón de asociación de estas fosfatasas al promotor de Mc2r es bifásico y coincide con el patrón de deacetilación de la histona H4 unida a este promotor. Además se pudo observar que las fosfatasas coimmunoprecipitaban con la histona deacetilasa 7 (HDAC-7). En conjunto, estos resultados sugieren que ambas fosfatasas podrían promover la desfosforilación de algún factor de transcripción en el contexto del promotor de Mc2r. Más aún, la utilización de inhibidores de serina/treonina fosfatasas en estas células repercutió negativamente sobre la transcripción del gen Mc2r, al impedir la unión de la ARN polimerasa II a su promotor. Estos trabajos demuestran la importancia de las proteínas fosfatasas en la regulación transcripcional en general. En este contexto es de destacar que en otro sistema se ha demostrado que la asociación de PP1 con HDAC-7 es necesaria para la desfosforilación de CREB [225].

III.1.b. Regulación de Proteínas Tirosina Fosfatasas por LH/ACTH

Las primeras observaciones que vincularon a las proteínas desfosforiladas en tirosina con los mecanismos de transducción de señales de las hormonas esteroideogénicas datan de principios de la década del 90. 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 desfosforilación de la paxilina, una proteína del citoesqueleto, a través de un mecanismo dependiente de PKA [226].

La estimulación de células esteroideogénicas en cultivo 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 PTPs 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 PTPs 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 [227].

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. Este hecho se correlaciona con un incremento transitorio de la actividad de PTPs en la fracción citosólica. Dado que la incubación *in vitro* de ZF de adrenal de rata con AMPc también incrementa la actividad de PTPs, se postuló que este efecto es mediado por la fosforilación dependiente de PKA [228].

Los trabajos siguientes se focalizaron en identificar las enzimas responsables del incremento de la actividad total de tirosina fosfatasa en la fracción citosólica y que son moduladas por acción de ACTH/AMPc. Mediante el análisis en geles de actividad de tirosina fosfatasa, se demostró que ACTH promueve la activación de tres PTPs en la fracción soluble de ZF de adrenal de rata, cuyos pesos moleculares son 115, 80 y 50 kDa

[228]. Más aún, posteriormente se demostró que en células de Leydig MA-10 la estimulación con LH/hCG también promueve la activación de PTPs, en este caso de 110-115 kDa y 50 kDa respectivamente [229]. Con respecto a la fosfatasa de 115 kDa se comprobó que su actividad se incrementa por fosforilación *in vitro* con PKA y que reúne características como para ser identificada con una PTP ampliamente descrita como reguladora de la fosforilación de paxilina, PTP-PEST (Dra. Alejandra Gorostizaga, Tesis Doctoral 2008, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA).

En células adrenocorticales bovinas se ha identificado a PTP1D como una tirosina fosfatasa activada por ACTH/PKA [85]. Recientemente en nuestro laboratorio se determinó que la PTP de 80 kDa de ZF de adrenal de rata que se activa por ACTH es PTP1D. Se demostró además que la fosforilación *in vitro* por PKA incrementa su actividad y que ACTH estimula la asociación *in vivo* de PTP-1D con la paxilina (Dra. Alejandra Gorostizaga, Tesis Doctoral 2008, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA).

III.1.c. Regulación de Proteínas Fosfatasas Duales por LH/ACTH

En células esteroideogénicas, además de demostrarse la presencia de proteínas con actividad de tirosina fosfatasas y serina/treonina fosfatasas como se mencionó anteriormente, se ha demostrado la expresión de una fosfatasa de actividad dual de la familia de las MKPs, la MAP Quinasa Fosfatasa-1 (MKP-1).

En nuestro laboratorio se ha descrito que en células adrenocorticales de la línea Y1, ACTH y su segundo mensajero AMPc promueven la inducción rápida y transitoria de MKP-1. En estas células la inducción promovida por ACTH está mediada por mecanismos dependientes e independientes de PKA, ya que la utilización de un inhibidor de dicha quinasa no bloqueó completamente el efecto promovido por la hormona [107]. Además hemos demostrado que el AMPc, también promueve la inducción de esta fosfatasa en células de Leydig de la línea MA-10 [230].

En células adrenocorticales humanas H295R se ha descrito que ACTH incrementa los niveles del ARNm y de la proteína de MKP-1. Incluso se demostró la fosforilación *in vitro* de esta proteína por PKA [231]. Por otra parte también se ha comprobado que otra

hormona esteroideogénica como Angiotensina II también provoca la inducción de MKP-1 en células adrenales bovinas [232].

Lo expuesto en esta sección indica que la inducción hormonal de fosfatasa de actividad dual de la familia de las MKPs, al menos MKP-1, es un evento común en células esteroideogénicas. Este hecho, sumado a que la actividad de MAPKs, en particular ERK1/2, está fuertemente relacionada con la activación de la esteroideogénesis, nos lleva a hipotetizar que la inducción de MKPs por hormonas esteroideogénicas es un mecanismo adicional de regulación del proceso esteroideogénico.

Es importante destacar en esta sección que el mecanismo principal de regulación de las MKPs involucra cambios en los niveles de expresión de las mismas. Este mecanismo tiene una cinética lenta comparada con el que corresponde a la modulación de la actividad por modificación covalente, por ejemplo la activación de determinadas tirosina fosfatasa por estímulo hormonal. Por lo tanto en células esteroideogénicas, las hormonas tróficas correspondientes son capaces de producir el cambio en la actividad de tirosina fosfatasa por dos mecanismos diferentes: la activación rápida de PTPs por fosforilación y la inducción de un miembro de la familia de las MKPs, MKP-1.

III.2. FUNCIÓN DE PROTEÍNAS FOSFATASAS EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

III.2.a. Participación de PTPs en la regulación de la esteroideogénesis

Los trabajos de Han y Rubin demostraron que ACTH dispara la desfosforilación de la paxilina, una proteína que participa en los arreglos del citoesqueleto [226]. Se demostró además que en células adrenales bovinas [227] y en ZF de adrenal de rata [228] la estimulación con ACTH produce el mismo efecto. Estos resultados plantean la hipótesis acerca de la participación de las PTPs en la esteroideogénesis a través de la modulación de la arquitectura del citoesqueleto.

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 [233]. Durante mucho tiempo se ha debatido acerca de la relación existente entre la arquitectura

del citoesqueleto y la estimulación hormonal de la esteroidogénesis. 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 esteroidogénesis.

En algunos estudios realizados utilizando células adrenocorticales de la línea Y1 y adrenales de rata, se observó que agentes que disrumpen la estructura microtubular provocan un incremento en la producción de esteroides. En base a estos estudios se ha postulado que la remoción del esqueleto microtubular podría eliminar la barrera física entre las gotas lipídicas conteniendo colesterol y la mitocondria [233, 234]. Otros estudios indican que tanto en células de Leydig de rata [235] como células Y1 [236] los agentes antimicrotubulares estimulan la esteroidogénesis basal pero inhiben la esteroidogénesis inducida hormonalmente. Se postula que el incremento en la esteroidogénesis 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_{scc} [236]. La inhibición sobre la esteroidogénesis 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 [237].

Por lo discutido queda claro que la participación de los diferentes componentes del citoesqueleto en la estimulación hormonal aguda de la esteroidogénesis aún no se ha establecido. Por lo tanto, hasta el presente no se puede inferir si la desfosforilación de la paxilina por las PTPs activadas por LH/ACTH altera la magnitud de la respuesta esteroidogénica a la estimulación hormonal aguda.

Independientemente de una acción a nivel del citoesqueleto, las tirosina fosfatasas podrían participar en la regulación de la esteroidogénesis, actuando en algún paso de la cascada de señalización hormonal, o sobre algún evento necesario en la síntesis de esteroides. Con el fin de conocer si la actividad de tirosina fosfatasas tiene una función en la estimulación hormonal de la esteroidogénesis, se evaluó la producción de esteroides de células estimuladas en presencia de compuestos que inhiben la actividad de estas enzimas (pervanadato y óxido de fenilarsina). 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 LH como por ACTH requiere de la acción de PTPs en un punto localizado luego de la activación de PKA y previo al transporte del colesterol a la mitocondria [228, 238].

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 PTPs, 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 [223, 229], 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.

Recientemente se demostró que la inhibición de la actividad de tirosina fosfatasa bloquea la inducción por AMPc de la proteína Acs14 y de StAR y que este efecto puede ser revertido por el agregado de ácido araquidónico [239]. Como hemos mencionado, la liberación de AA, proceso que requiere la actividad de Acs14 en células esteroidogénicas, interviene en la inducción de la proteína StAR. Dado que la inducción de Acs14 es bloqueada por inhibidores de PTPs, podría postularse que la actividad de tirosina fosfatasas sobre la inducción de la proteína StAR, estaría mediada por la liberación de AA [240].

Los trabajos discutidos en esta sección revelan que la activación de tirosina fosfatasas es un proceso necesario para que las hormonas esteroidogénicas promuevan la síntesis de esteroides. Aunque el mecanismo molecular exacto aún no está completamente dilucidado, se sabe que la actividad de tirosina fosfatasas participa en la inducción hormonal de la proteína StAR. Por lo tanto a este tipo de fosfatasas se le adjudica un rol en el “encendido” del proceso esteroidogénico. Más aún, datos recientes de nuestro grupo avalan la hipótesis acerca de la participación de PTP1D en este evento.

III.2.b. Participación de MKP-1 en la regulación de la esteroidogénesis

Se ha demostrado que otro evento para el cual es relevante la actividad de proteínas fosfatasas en células esteroidogénicas es la expresión de enzimas hidroxilasas de la familia del citocromo P450 (CYPs) que intervienen en la biosíntesis de esteroides. Estas hidroxilasas son inducidas como parte de la regulación hormonal crónica.

Los estudios realizados en células adrenocorticales humanas de la línea H295R sobre la transcripción del gen hCYP17, que codifica para la 17 α -hidroxilasa, indicaron que los inhibidores de serina/treonina y tirosina fosfatasas incrementan la unión del factor de transcripción SF-1 al promotor de este gen, aumentando su actividad transcripcional ante el estímulo con ACTH/AMPc. Además, en este trabajo se observó que el grado de fosforilación del SF-1 disminuía en respuesta al estímulo hormonal. En base a estos estudios, se sugirió que una fosfatasa de actividad dual dependiente de AMPc estaría involucrada en la regulación de la actividad del factor de transcripción SF-1 [241]. En trabajos posteriores de este grupo se analizó la participación de MKP-1 en la inducción del hCYP17. Mediante experimentos de sobre-expresión e inhibición de la expresión de esta fosfatasa corroboraron su rol en la regulación de este gen, y concluyeron que MKP-1 promueve el incremento en los niveles del ARNm de CYP17 posiblemente a través de la desfosforilación de SF-1, aunque no se analizó el grado de fosforilación de este factor [231].

En células adrenocorticales murinas, se ha estudiado la participación del SF-1 en la regulación transcripcional del gen del receptor de ACTH (Mc2r). En estas células, la estimulación con la hormona indujo un patrón cíclico de asociación del SF-1 al promotor del gen Mc2r de características bifásicas. Al comienzo del estímulo el grado de asociación del SF-1 a este promotor aumentaba rápidamente y luego disminuía significativamente a los 80 minutos de estimulación, tiempo en el cual se observa el máximo de expresión de la proteína MKP-1. Cuando se analizó la cinética de fosforilación del SF-1 y de la expresión de MKP-1 se vio que el momento de máxima expresión de MKP-1 coincidía con una disminución del nivel de SF-1 fosforilado. Este hecho llevó a dos conclusiones, primero, que es necesaria la desfosforilación de SF-1 luego de la primera ronda de transcripción del gen Mc2r probablemente para permitir la participación de otros factores de transcripción sobre el promotor de dicho gen. Segundo, que la actividad de MKP-1 es necesaria para el pasaje

a la segunda ronda de transcripción del gen *Mc2r* debido a que esta fosfatasa sería la responsable de promover la desfosforilación del SF-1 [224].

Los trabajos mencionados en este punto indican que es necesaria la actividad de MKPs en la transcripción de genes relacionados con la esteroidogénesis, regulados por acción hormonal en la fase crónica. En particular en estos trabajos se determinó que la acción de MKPs repercute en el grado de fosforilación de SF-1 y que tanto la forma fosforilada como la desfosforilada de este factor son componentes de la maquinaria transcripcional. Aún no ha sido establecido si este mecanismo también opera en la transcripción de genes esteroidogénicos de la etapa aguda. Dado la inducción de StAR es dependiente de la fosforilación de SF-1 por ERK1/2, la expresión de MKP-1 podría, a través de su acción sobre esta quinasa, participar en el cierre de la acción hormonal aguda. Sin embargo la participación de MKP-1 en la regulación de estos genes parece ser más compleja, pudiendo tener efectos opuestos dependiendo de la cinética de inducción de los mismos.

En resumen, y en base a lo expuesto en los dos últimos capítulos de esta Introducción, se puede señalar que la biosíntesis de hormonas esteroideas es un proceso altamente regulado. Según se ha mencionado, la esteroidogénesis no sólo está regulada por proteína quinasas, sino también por proteínas fosfatasas. En particular la enzima MKP-1 parece tener un papel preponderante en eventos transcripcionales dependientes de ERK1/2. Es conocido que la fosforilación de SF-1 parece estar finamente regulada por el balance entre la actividad de las MAPKs y la actividad de MKPs [224].

Aunque en otros sistemas se conoce que la expresión de MKP-1 está regulada a distintos niveles, se desconoce si estos mecanismos regulatorios son disparados también por las hormonas esteroidogénicas. Con el fin de analizar estos aspectos y obtener información acerca de la función de esta enzima en células esteroidogénicas, en esta Tesis Doctoral se identificarán los mecanismos de regulación transcripcional y post-traducciona l de MKP-1 en células de Leydig de la línea MA-10 y adrenocorticales de la línea Y1 por acción hormonal y se estudiará además el rol de esta fosfatasa en la expresión de proteínas claves del proceso esteroidogénico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los antecedentes descriptos en relación con la participación de las MAP quinasas, particularmente ERK1/2, en la regulación hormonal de la producción de esteroides ponen en evidencia la importancia de mantener un control estricto de la actividad de estas enzimas. En este contexto surge la importancia de las enzimas que controlan la magnitud y el tiempo de acción de las MAP quinasas: las MAP quinasas fosfatasa (MKPs). Los niveles de estas enzimas y su actividad en un dado compartimento subcelular y en un determinado tiempo permiten acotar de manera precisa en el aspecto temporal y espacial la actividad de las MAP quinasas.

La inducción de la proteína StAR es un evento crucial en la regulación hormonal de la síntesis de esteroides por su capacidad de estimular el paso limitante de la esteroidogénesis. Considerando que las MAP quinasas ERK1/2 son activadas por hormonas que regulan la esteroidogénesis y que estas enzimas participan tanto en la inducción de StAR como en la fosforilación y activación de ésta, planteamos como hipótesis que la regulación de MKPs por las hormonas esteroidogénicas es un mecanismo para el control del cierre de la actividad de MAP quinasas y por ende, del proceso esteroidogénico.

Específicamente en este trabajo nos abocamos al análisis de la regulación de MKP-1. Postulamos que la actividad de MKP-1 podría contribuir a cerrar la acción hormonal sobre la expresión del gen que codifica para la proteína StAR a través de un mecanismo que promueve el estado desfosforilado de factores de transcripción que participan en este proceso y que son activados por fosforilación dependiente de ERK1/2 ante el estímulo hormonal y/o la inhibición de la expresión de factores de transcripción cuya inducción es dependiente de ERK1/2.

Con el fin de analizar la hipótesis planteada nos fijamos como objetivo general ***analizar la regulación hormonal de MKP-1 en células esteroidogénicas y establecer el papel funcional de esta enzima en estas células.***

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

1- Analizar la regulación transcripcional de MKP-1 por acción de LH en células de Leydig de la línea MA-10.

2- Estudiar la regulación post-traduccionaI de MKP-1 ejercida por LH y ACTH en células de Leydig de la línea MA-10 y adrencorticales de la línea Y1, respectivamente y caracterizar el mecanismo correspondiente.

3- Establecer el rol funcional de MKP-1 sobre la síntesis de esteroides en células de Leydig de la línea MA-10.

4- Establecer los efectos de MKP-1 sobre la expresión de los genes STARD1, CYP11A1 y NUR77.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. REACTIVOS UTILIZADOS

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): el medio de cultivo Waymouth MB732, anticuerpo anti-flag, 8-Br-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (8Br-AMPC), N-[2-(p-bromocinamilamino)-etil]-5 isoquinolinasulfonamida (H-89), PD98059, actinomicina D (actD), seroalbúmina bovina (BSA), oligonucleótidos *random*, estándares de peso molecular para electroforesis, HEPES, ditiotreitól, ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA), sacarosa, Tris, ácido etilén glicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetraacético (EGTA), glicina, glutation, leupeptina, pepstatina A, Tritón X-100, dodecil sulfato de sodio (SDS), Temed™.

Las enzimas de restricción, la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), Go Taq ADN polimerasa, Pfx Platinum ADN polimerasa, dNTPs, inhibidor de ribonucleasas RNasin® y diversos reactivos de biología molecular fueron provistos por Promega (Madison, WI, USA). Los oligonucleótidos utilizados para amplificación por PCR y la Lipofectamina 2000 fueron adquiridos en Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). La agarosa D1-LE se adquirió en Biodynamics (Ciudad de Bs. As., Argentina).

El material plástico para cultivo se compró a Corning-Costar (NY, USA). La Tripsina-EDTA, antibióticos, suero equino, TRIzol® se adquirieron a la empresa Gibco-Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA).

Los anticuerpos utilizados fueron del siguiente origen: el anticuerpo policlonal anti-MKP-1, que también reconoce a la isofoma MKP-2, fue comprado a Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, USA); el anticuerpo contra las formas fosforiladas y no fosforiladas de ERK1/2 fueron comprados a Cell Signaling (Beverly, MA, USA); el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina fue comprado a Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA); el anticuerpo policlonal anti-StAR fue producido en nuestro laboratorio; el anticuerpo monoclonal anti-subunidad 2 del complejo III fue adquirido a Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA); los anticuerpos anti-IgG de ratón y de conejo desarrollados en cabra y conjugados con peroxidasa fueron de BioRad Laboratories (Hércules, California, USA).

Las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), reactivos (acrilamida, bisacrilamida y otros) y equipos de electroforesis (Mini-Protean II, equipos de transferencia

y de secado de geles) fueron provistos por BioRad Laboratories. El equipo de electroforesis para geles de agrosa Gel XL ultra V-2 es de Labnet International (Edison, NJ, USA). El reactivo de detección de Western blot por quimioluminiscencia (ECL) se adquirieron en GE Argentina (Buenos Aires, Argentina).

El material radioactivo fue adquirido en la empresa PerkinElmer (Boston, MA, USA): [³²P] Fosfato y [γ -³²P]-ATP.

II. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

- Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes: pGL3-StAR, gentilmente cedido por Colin Jefcoate, Department of Pharmacology, University of Wisconsin-Madison Medical School, Madison, Wisconsin, USA, [242], pGL3-CYP11A1, gentilmente cedido por Bon-chu Chung, Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan, republica de China, [243], pGL3-NUR77, gentilmente cedido por Takashi Yazawa, Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui, Japan, [216] y pFLAG-ERK2, gentilmente cedido por Melanie Cobb, Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA [244].

El plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega) (Figura 7) fue utilizado para subclonar los productos amplificados en las reacciones de PCR como se explicará a continuación.

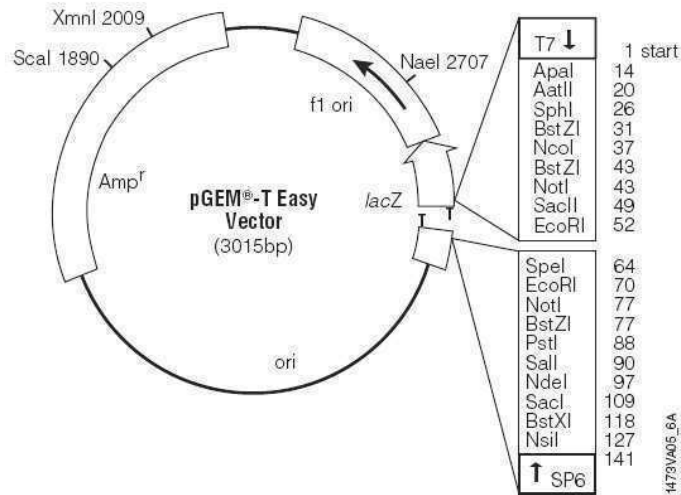


Figura 7: Mapa del plásmido comercial pGEM®-T Easy.

El vector de expresión pRc/CMVi [245] se utiliza para estudios de sobre-expresión de proteínas en eucariotas. Este plásmido es una modificación basada en la digestión con *Bam*HI y posterior religación del plásmido pRc/CMV originalmente obtenido de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) (Figura 8).

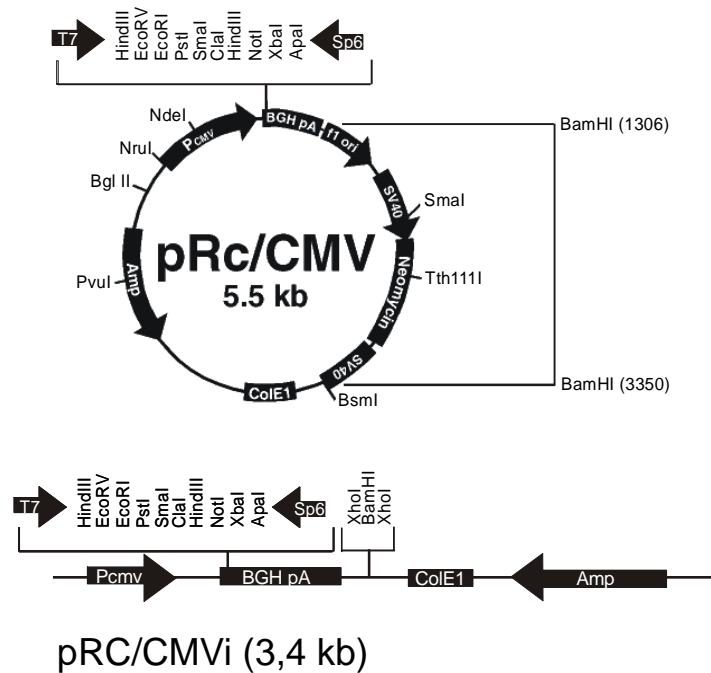


Figura 8: Mapas del plásmido comercial pRc/CMV y de su versión modificada pRc/CMVi.

El plásmido p3XFLAG-CMV-7.1 (Sigma) (Figura 9), se utiliza para estudios de sobre-expresión de proteínas fusionadas a una secuencia específica de aminoácidos (flag) que permite su identificación mediante un anticuerpo comercial anti-flag.

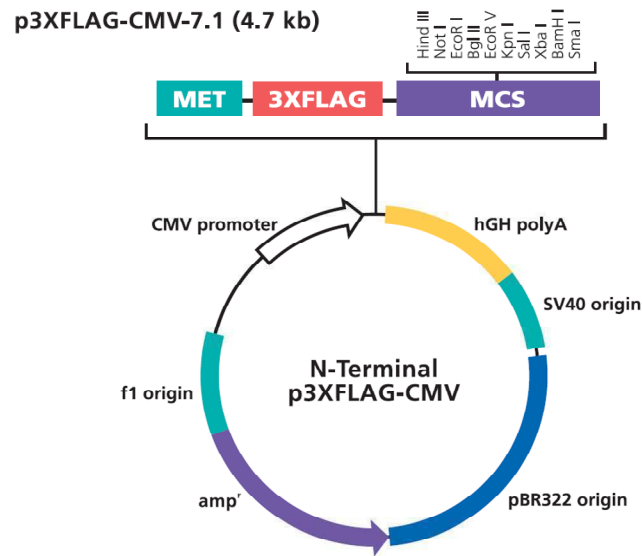


Figura 9: Mapa del plásmido comercial p3xLFLAG-CMV-7.1.

El plásmido pSUPERretro (OligoEngine), es un vector de expresión de ARN pequeños de interferencia (siRNA). Este vector fue utilizado en los estudios de disminución de expresión de proteínas en células eucariotas (Figura 10).

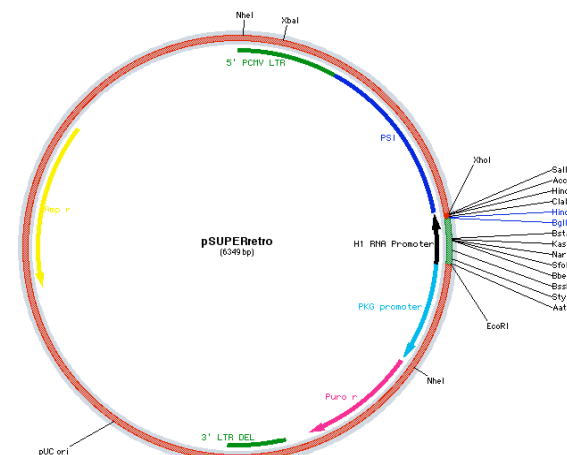


Figura 10: Mapa del plásmido comercial pSUPERretro.

- Electroforesis en geles de agarosa

Para muestras de ADN se utilizaron geles de agarosa de distintos porcentajes (por lo general entre 1-1,5% p/v) conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y preparados en solución TAE (4,84 g Tris, 1,14 ml ácido acético glacial, 0,74 g Na₂EDTA·2H₂O en agua deionizada csp 1 litro). La separación se realizó en un aparato de electroforesis horizontal bajo voltaje constante (80 voltios). La visualización de los fragmentos se realizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de 305 nm. Las imágenes de los geles fueron obtenidas con el analizador Gel-Pro (IPS, North Reading, MA, USA).

- Purificación de fragmentos de ADN

Se utilizó este método con el fin de purificar los productos de amplificación por PCR y los fragmentos obtenidos de corte con enzimas de restricción.

Se realizó una electroforesis de las muestras de ADN en un gel de agarosa. Las bandas de interés fueron escindidas y purificadas utilizando el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Se adicionaron al tubo 10 µl de solución de unión a la membrana (isotiocianato de guanidina 4,5 M, acetato de potasio pH 5 0,5M) por cada 10 mg de gel de agarosa y se incubó 10 minutos a 55-65°C, mezclando vigorosamente cada 2 minutos para disolver la agarosa. Se transfirió la mezcla de gel disuelto a una minicolumna Wizard[®] conteniendo una membrana de sílica, se incubó por 1 minuto y centrifugó durante 1 minuto a 16.000xg. El ADN quedó adherido a la sílica, se descartó el eluido y se lavó la columna con 700 µl de solución de lavado de la membrana (acetato de potasio pH 5,0 10 mM; EDTA, 7 µM, pH 8 16, etanol 80%) y se repitió el centrifugado. Se realizó un segundo lavado con 500µl de solución, centrifugando esta vez durante 5 minutos. Se descartó el eluato y se centrifugó 1 minuto adicional. Se eluyó el ADN con 50 µl de H₂O libre de nucleasas, con una centrifugación de 1 minuto a 16000 x g.

- Ligación en el plásmido pGEM[®]-T Easy

Los fragmentos de ADN purificados por gel se ligaron al plásmido pGEM[®]-T Easy para

su posterior secuenciación y análisis. Se colocó 1 μ l de solución amortiguadora 10x para ADN ligasa de T4 (Tris-HCl 300 mM, pH 7,8, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM, polietilenglicol 10%), 1 μ l (50 ng) del vector, la cantidad correspondiente del fragmento de ADN a ligar en relación 3:1 (inserto:vector) y 1 μ l de ADN ligasa de T4 (3U) y H₂O en un volumen final de 10 μ l. Se dejó transcurrir la reacción durante toda la noche a 4°C. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-Blue.

- Digestión con endonucleasas de restricción

Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Para ello 1 μ g de ADN se digirió con 5U de la enzima de restricción en una mezcla de reacción que contenía 2 μ l de solución amortiguadora 10x adecuada para cada enzima, BSA acetilada 2 μ g/ μ l y H₂O hasta un volumen final de 20 μ l. La incubación fue realizada durante 3 horas a 37°C con agitación suave. Los productos de la digestión se resolvieron en gel de agarosa y luego fueron purificados a partir del gel como se comentó previamente.

- Desfosforilación de vectores y reacción de ligación

A 20 μ l del producto purificado de la reacción de digestión con endonucleasas de restricción, se le adiciona 26U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera en una solución amortiguadora y se deja transcurrir la reacción durante 20 minutos a 37°C. La reacción es finalizada por incubación a 65°C durante 15 minutos. A continuación el producto es purificado con el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

La reacción de ligación se realizó combinando 1 μ l del vector desfosforilado (100ng), 2 μ l de solución amortiguadora de ligación 2X (Promega), 1 μ l de ADN ligasa de T4 (3 U/ μ l) y la cantidad correspondiente de inserto en un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó toda la noche a 15°C.

- Cepas bacterianas y medios de cultivo de bacterias

La cepa de *Escherichia coli* que se utilizó en los subclonados fue: XL1-Blue de Stratagene Labs Systems (La Jolla, CA, USA). Su genotipo es: endA1, gyrA96, hsdR17, lac⁻, recA1, relA1, supE44, thi-1, [F⁻ lacI^qZ Δ M15, proAB, Tn10].

Estas bacterias se cultivaron en el medio Luria-Bertani (LB) cuya composición es 10 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl en 1 litro de agua. Para seleccionar colonias transformadas con plásmidos que les otorgan resistencia a ampicilina, el medio LB fue suplementado con 50 µg/ml de este antibiótico. Para preparar placas con medio de cultivo sólido, se agregaron 15 g/litro de agar.

- Preparación de bacterias competentes

Para la preparación de bacterias competentes, se inoculó una colonia aislada de la cepa XL1-Blue en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación continua durante toda la noche. A continuación, se hizo una dilución 1:100 sembrando alícuotas de 100 µl de bacterias en 10 ml de medio LB fresco y se incubó en agitador nuevamente a 37°C hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial ($DO_{600nm} = 0,4-0,6$). Luego el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos y el sedimento resuspendido en 5 ml de CaCl₂ 50 mM frío y estéril. La suspensión fue mantenida en hielo durante 20 minutos repitiendo posteriormente el paso de centrifugación. En este caso el sedimento obtenido fue resuspendido en 1 ml de solución fría de CaCl₂ 50 mM e incubado durante toda la noche a 4°C con el agregado de glicerol (25%). A continuación las células fueron fraccionadas en alícuotas de 200 µl y se conservaron a -70°C.

- Transformación de *Escherichia coli* competentes

Todos los materiales para el procedimiento de transformación, incluyendo las soluciones y los tubos de polipropileno, fueron mantenidos a 4°C durante todo el procedimiento.

El método empleado es una variación del método de Hanahan. Las bacterias competentes fueron descongeladas en un baño de hielo/H₂O. En un tubo Eppendorf frío se colocaron 10 µl de la solución de ADN plasmídico (0,1 µg) y se adicionaron 200 µl de la suspensión de células competentes mezclando con pipeta para homogeneizar la mezcla. Se dejó estabilizar a 4°C durante 30 minutos y luego se realizó un choque térmico a 42°C por 45 segundos, seguido inmediatamente por una incubación en hielo durante otros 2-3 minutos. Posteriormente se adicionaron 500 µl de medio LB fresco (sin antibióticos) y se

incubaron a 37°C durante 60 minutos con agitación, para lograr la recuperación de las células. Finalmente se centrifugaron a temperatura ambiente a 10000 rpm durante 3 minutos y se cultivaron las bacterias en placas conteniendo LB agar con ampicilina. Las placas fueron incubadas en estufa toda la noche a 37°C.

- Aislamiento y purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (MINIPREP)

Las colonias bacterianas transformadas seleccionadas se inocularon en 3 ml de LB con ampicilina y se incubaron durante la noche a 37°C con agitación continua. Se utilizó el sistema Wizard® (Promega) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. El cultivo obtenido se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspendió en 200 µl de una solución conteniendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM y ARNasa A 100 µg/ml. A continuación se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 200 µl de solución de neutralización (acetato de potasio 1,32M, pH 4,8). La suspensión resultante se centrifugó a 10000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se trasvasó a una columna conteniendo la resina DNA Wizard® (Promega). Se centrifugó la columna a 10000xg durante 2 minutos. El ADN plasmídico quedó retenido en la columna y la matriz se lavó con 2 ml de una solución conteniendo: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM y etanol 55%. Luego se volvió a centrifugar a 10000xg durante 2 minutos. Por último se eluyó el ADN de la resina con 50 µl de agua libre de nucleasas precalentada a 60°C y se centrifugó una última vez a 10000 x g durante 2 minutos, recolectando el eluato en un tubo nuevo.

- Aislamiento y purificación de ADN plasmídico a mediana escala (MIDIPREP)

Las colonias bacterianas transformadas seleccionadas se inocularon en 100 ml de LB con ampicilina y se incubaron durante la noche a 37°C con agitación continua. Se utilizó el sistema Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. El cultivo obtenido se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sedimento se resuspendió con pipeta en 3 ml de una solución conteniendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM y ARNasa A 100 µg/ml. A continuación se adicionaron 3 ml de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 3 ml de solución de neutralización (acetato de potasio 1,32 M, pH 4,8). Se incubó a temperatura ambiente 10

minutos y la suspensión resultante se centrifugó a 14000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se trasvasó a un tubo conteniendo la resina DNA Wizard®. Se trasvasó la mezcla ADN/resina a una columna adaptada a una bomba de vacío. Luego de aplicar el vacío, el ADN plasmídico quedó retenido en la columna y la matriz se lavó dos veces con 15 ml de una solución conteniendo acetato de potasio 80 mM, Tris-HCl 8,3 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 10 µM y etanol 55%. Se secó la resina unos 30 segundos adicionales. Se transfirió la parte inferior de la columna a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10000 x g durante 2 minutos. Finalmente se eluyó el ADN de la resina con 300 µl de agua libre de nucleasas precalentada a 60°C y se centrifugó una última vez a 10000xg durante 20 segundos.

III. LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se utilizaron como modelo de estudio dos líneas celulares diferentes: la línea de células murinas de Leydig MA-10 y adrenocorticales de la línea Y1. Ambas son líneas celulares productoras de esteroides ampliamente caracterizadas y utilizadas para estos estudios.

- **La línea celular MA-10:** tuvo su origen en un tumor trasplantable murino de células de Leydig, M5480P [147]. Fue generosamente cedida por Mario Ascoli, University of Iowa, College of Medicine (Iowa City, IA, USA) y mantenida en medio Waymouth MB752/1 conteniendo NaHCO₃ 1,1 g/l, Hepes 20 mM, gentamicina 50 µg/ml, y suero equino 15% inactivado por calor. Estas células retienen la capacidad de unir LH/hCG, conservan los mismos pasos regulatorios que las células de Leydig, y producen progesterona (P4) como esteroide principal.

- **La línea celular Y1:** proveniente de un tumor adrenocortical murino, generosamente cedida por Bernard Schimmer (University of Toronto, Toronto, Canadá). Fue mantenida en medio Ham-F10, suplementado con suero equino (12,5%) y suero fetal bovino (2,5%), ambos inactivados con calor; NaHCO₃ 1,2 g/l, penicilina 200 IU/ml y sulfato de estreptomicina 200 mg/ml, en una atmósfera húmeda con CO₂ 5% [150].

IV. ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO

Las células MA-10 y Y1 fueron sembradas en una densidad de aproximadamente 5×10^4 o 1×10^5 o 4×10^5 células/pocillo de placas de cultivo de 48, 24 o 6 pocillos respectivamente y crecidas en estufa a 36°C, gasead a con 5% de CO₂. Luego de alcanzar el grado de confluencia apropiado, las células fueron arrestadas en la fase G1 del ciclo celular transfiriéndolas en la fase logarítmica del crecimiento a medio sin suero durante 24 horas.

La estimulación de las mismas se realizó por incubación en medio libre de suero en presencia o ausencia de las hormonas tróficas hCG, ACTH u 8Br-AMPC en concentraciones submáximas, según lo indicado en cada experimento. El tiempo de estimulación y concentración del estímulo utilizados se indica en la descripción de cada experimento en particular. Cuando se utilizaron H-89, PD98059, o actD, estos se agregaron al medio de cultivo durante 30 minutos previos al estímulo hormonal.

Al finalizar los tratamientos, los medios de cultivo fueron colectados para detectar el contenido de progesterona (P4) por radioinmunoanálisis (RIA). La monocapa de células se lavó con solución salina NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM (PBS pH 7,4) para ser luego procesadas para la obtención del ARN o las proteínas.

V. INCORPORACIÓN DE [³²P] FOSFATO EN CÉLULAS EN CULTIVO

Se agregó [³²P]PO₄³⁻ (actividad específica 285,6 Ci/mg) a los cultivos de células MA-10 en placas de 24 pocillos (200 μCi/ml) en medio DMEM con bajo contenido de fosfatos. Luego de 4 horas de incubación a 37°C en atmósfera humidificada y con 5% de CO₂, las células incorporaron entre un 40-50% de marca radioactiva. Finalizada esta etapa, los cultivos celulares fueron utilizados para evaluar el grado de fosforilación de la proteína flag-MKP-1 como se indica en Resultados.

VI. OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES

Luego de los diferentes tratamientos realizados las células fueron lisadas. La lisis fue realizada con una solución conteniendo Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl

125 mM y Tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasas (leupeptina 10 μ M, pepstatina A 1 μ M, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 200 μ M, NaF 50 mM y β -glicerol fosfato 40 mM). Las células fueron cosechadas mecánicamente y de la suspensión obtenida se realizó la cuantificación de proteínas, que luego fueron analizadas por Western blot. Cuando el homogenato fue utilizado para valorar actividad de tirosina fosfatasa en solución, se omitió el agregado de Na_3VO_4 .

VII. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE TIROSINA FOSFATASA EN LISADOS CELULARES

- Fosforilación de poli-glutámico-tirosina

La fosforilación del poli-glutámico-tirosina (pGT) fue utilizada para los ensayos de medición de actividad de PTPs que se detalla en el siguiente punto. El sustrato pG ^{32}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). La reacción de fosforilación se realizó en un volumen de 170 μ l de una solución conteniendo 0,3 mg pGT, HEPES 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NaAc 12 mM, MnCl_2 2 mM, DTT 2 mM, Triton X-100 0,02%, ATP 0,1 mM, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 300 μ 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 μ 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 μ 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 μ l. Para seleccionar la fracción conteniendo pG ^{32}P T, se cuantificó la radiactividad en cada fracción eluida en un contador β (efecto Cherenkov). El pG ^{32}P T eluido, usado como sustrato en los ensayos de desfosforilación, tuvo una actividad específica aproximada de 2×10^7 cpm/mg.

- Ensayo de actividad de tirosina fosfatasa

En este ensayo se evaluó la actividad de tirosina fosfatasa midiendo la liberación de ^{32}Pi del pGT marcado radiactivamente. La muestra se incubó con el sustrato radiactivo

(radiactividad ofrecida: 30000-40000 cpm/tubo) en una solución conteniendo imidazol 25 mM (pH 7,4), BSA 2 mg/ml y β -mercaptoetanol 2 %. Luego de incubar durante 10 minutos a 30°C se agregan 20 μ 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 180 μ l de TCA 20%. Luego de incubar durante 5 minutos a 4°C, se realizó una centrifugación de 5 minutos a 12000 x g para separar el precipitado proteico del sobrenadante. Posteriormente el sobrenadante conteniendo el Pi liberado se transfirió a un tubo para cuantificar la radiactividad debida al ^{32}Pi en un contador de centelleo β . Con la metodología descrita, la radiactividad liberada (^{32}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 lisados totales de células MA-10 transfectadas con el vector pRc/CMV conteniendo el ADNc de MKP-1 en orientación sentido o el vector vacío. La actividad de tirosina fosfatasa se expresó como pmoles de Pi liberado por minuto por ml de muestra.

VIII. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

- Determinación de proteínas por el método de Bradford

La concentración de proteínas en las muestras fue determinada siguiendo el método descrito por Bradford [246], usando albúmina sérica bovina como proteína patrón.

- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas provenientes de lisados celulares totales o mitocondriales (20-25 μ g) fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) conforme a la técnica descrita por Laemmli. Se realizaron geles planos de poliacrilamida entre placas de vidrio, utilizando el sistema MiniProtean III System de BioRad. El gel separador se preparó con acrilamida 10 o 12%, bisacrilamida 0,22% en Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 conteniendo SDS 0,1%. La composición del gel concentrador fue acrilamida 5% y bisacrilamida 0,136% en Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 conteniendo SDS 0,1%. Las muestras a sembrar en los geles fueron preparadas en solución de siembra

conteniendo Tris-HCl 0,062 M, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,1% y hervidas para su completa desnaturalización. La electroforesis fue llevada a cabo a temperatura ambiente en solución amortiguadora Tris-HCl 0,025 M, pH 7,4, glicina 0,190 M y SDS 0,1%, aplicándose voltaje constante de 100 voltios aproximadamente.

- Western blot

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF en una solución amortiguadora conteniendo Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, y metanol 20%, a un voltaje constante de 2,4 mA/cm² durante 90 minutos.

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 las proteínas por lavados con metanol.

Las membranas fueron luego incubadas en solución salina-Tris (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, TBS) conteniendo Tween 20 0,5% (TTBS) con leche en polvo libre de grasas al 5% o BSA al 1% (solución de bloqueo) durante 60 minutos a temperatura ambiente para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos. Luego, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con las diluciones apropiadas del anticuerpo primario a analizar.

Posteriormente la membrana fue lavada 3 veces por 10 minutos en TTBS. Luego las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa en una dilución adecuada (1/3.000-1/20.000). Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y un último lavado con TBS. Finalmente la señal fue detectada por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL y autorradiografía.

- Fraccionamiento subcelular: obtención de las fracciones nuclear y mitocondrial

El aislamiento de las fracciones nuclear y mitocondrias fue realizado mediante centrifugación diferencial. Brevemente, células MA-10 fueron lavadas con PBS y

cosechadas en una solución amortiguadora conteniendo: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, sacarosa 250 mM, EDTA 0,1 mM (solución amortiguadora TSE). Luego fueron homogeneizadas con un homogeneizador manual (Pellet pestle motor homogeniser, Kontes) y los homogenatos celulares fueron filtrados previamente con un filtro PES-77 (Polynom, Suiza), para eliminar restos celulares. Luego los homogenatos fueron centrifugados a 1000 x g durante 15 minutos de manera de obtener la fracción nuclear en el sedimento. Esta fracción fue lavada dos veces con solución amortiguadora TSE, centrifugada a 1000 x g durante 15 minutos y luego resuspendida en la misma solución amortiguadora.

El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 15000 x g durante 15 minutos para obtener la fracción mitocondrial (sedimento) y una fracción post-mitocondrial (sobrenadante). La fracción mitocondrial fue lavada dos veces con solución amortiguadora TSE, centrifugada a 15000 x g durante 15 minutos y luego resuspendida en la misma solución amortiguadora.

- *Medición de lactato deshidrogenasa*

Las fracciones nucleares y mitocondriales fueron sometidas a análisis enzimático para determinar su pureza. Se determinó la cantidad de NADH consumido, agregando 25 µg de proteínas de la muestra a 1 ml de solución amortiguadora de reacción. La reacción se desarrolló a 25°C, en solución amortiguadora fosfato de potasio 100 mM, pH 7, en presencia de Tritón X-100 1%, piruvato 30 mM y NADH 220 µM. Se midió la absorbancia a 340 nm y se utilizó $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad se expresó como µmoles de NADH consumidos / mg de proteínas por minuto.

Se determinó de esta manera que ambas fracciones sólo presentaron aproximadamente un 10% de contaminación citosólica, valor aceptado por la bibliografía para fraccionamiento a partir de cultivos celulares [247].

- *Inmunoprecipitación*

Para la inmunoprecipitación de la proteína flag-MKP-1 se utilizó un lisado total de células MA-10. Las muestras (400 µg de proteínas) se incubaron durante 1 hora a 4°C en presencia de 2 µg del anticuerpo monoclonal anti-flag en un volumen final de 0,5 ml de

solución de inmunoprecipitación (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 0,1%, e inhibidores de proteasas y fosfatasa). Luego se agregó 40 µl de proteína A/G plus-agarosa y se incubó durante 16 horas. Luego de esta incubación, las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 4 minutos. Los sobrenadantes se descartaron y los precipitados se lavaron por centrifugación cuatro veces con 0,5 ml de una solución de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 1 M) y finalmente se resuspendieron en solución de siembra. Las muestras así preparadas se analizaron por Western blot o por SDS-PAGE seguida de autorradiografía.

IX. ANÁLISIS DEL ARN Y ADN

- Extracción de ARN total

Para la obtención de ARN total se utilizó el reactivo *TRIZOL*TM siguiendo la técnica recomendada por el fabricante. Las células de la monocapa se lisaron por agregado de 1,2 ml de *TRIZOL*TM por pocillo de 6 cm de diámetro y disrupción mecánica con pipeta automática. Luego, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para producir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. A continuación se agregó cloroformo (0,24 ml/ml de *TRIZOL*TM) a las muestras. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se aisló la fase acuosa, se le agregó alcohol isopropílico (0,5 ml/ml de *TRIZOL*TM) 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 el precipitado del ARN. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el ARN precipitado se lavó con etanol 75% (1 ml/ml de *TRIZOL*TM). Luego de centrifugar a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C se retiró el sobrenadante y el ARN precipitado se secó al aire durante 10 minutos. Luego se agregaron 20 µl de agua libre de RNasas y se incubó durante 10 minutos a 55-60°C para una disolución completa del ARN.

- Reacción de transcripción reversa (RT)

Para estas reacciones se utilizó la transcriptasa reversa derivada del virus de la leucemia murina de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, M-

MLV RT), que es una ADN polimerasa dependiente de ARN que puede utilizarse para sintetizar ADNc a partir de templados de ARNm largos (>5 kb).

Para realizar la RT de los ARNm se utilizaron 2 µg de ARN total y 1 µg de oligonucleótidos al azar (*random*), llegando a un volumen de 15 µl con H₂O tratada con DEPC. La mezcla fue incubada 5 minutos a 70°C para desarmar las estructuras secundarias del ARN, y luego fue colocada rápidamente a 4°C durante 1 minuto. Se le adicionaron 10 µl de una mezcla de reacción conteniendo 200 unidades de la enzima M-MLV RT, 1,25 mM de cada dNTP, 25 unidades del inhibidor de ARNasas RNAsin® (1 U/ µl) en la solución de reacción de la enzima (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM y DTT 10 mM). Luego las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C. Luego de finalizada la reacción se tomaron alícuotas de 1-2 µl del ADNc obtenido y se efectuaron reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó un método estándar donde la reacción de amplificación del ADN se llevó a cabo en una solución amortiguadora conteniendo Tris/HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 0,1 mg/ml de BSA, 10 mM de cada uno de los dNTPs, 50 pmoles de cada oligonucleótido, 2,5 unidades de platinum *Pfx* ADN polimerasa y 0,1 µg de ADN templado.

Se amplificaron dos fragmentos a partir del ADNc de MKP-1 de ratón (NM_013642) los cuales fueron luego utilizados para generar los vectores de expresión pRc/CMV-MKP-1 sentido y antisentido (fragmento de 1,7 kb) y pFLAG-MKP-1 (fragmento de 1,4 kb). Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR se describen en la tabla 1 y las condiciones de amplificación se describen a continuación:

- **Fragmento de 1,7 kb (nucleótidos 27 a 1796):** a) 2 minutos a 95°C, b) 50 segundos a 95°C, c) 30 segundos 57°C, d) 4 minutos a 72°C y e) 5 minutos a 72°C, con una repetición de 35 ciclos desde el segundo hasta el cuarto paso.
- **Fragmento de 1,4 kb (nucleótidos 139 a 1450):** a) 2 minutos a 95°C, b) 50 segundos a 95°C, c) 30 segundos 53°C, d) 4 minutos a 72°C y e) 5 minutos a 72°C, con una repetición de 35 ciclos desde el segundo hasta el cuarto paso.

En ambos casos los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, luego purificados a partir del gel en la forma que se describió anteriormente. Los fragmentos de interés fueron subclonados en el vector pGEM[®]-T Easy.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	T _m (°C)	Amplicón	n° ciclos
MKP-1 directo	AAGAATTCAGATTAGGAG CAGCGAGCACCTTGG	58	1,7 kb	35
MKP-1 reverso	AAGAATTCACCTACACTGGCTTTGTCTGTCAG	56,7		
MKP-1 directo	AAGAATTCATGGTGATGGAGGTGG	52,6	1,4 kb	35
MKP-1 reverso	CTCTAGATGCCCTGTTTTGTCAGAG	54,2		

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para amplificar el ADNc de MKP-1 de ratón. Se muestran sus secuencias y las correspondientes T_m. Para cada par de oligonucleótidos se indica el tamaño del fragmento que amplifican (amplicón) y el número de ciclos utilizados para la reacción de PCR.

- Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa (PCR semicuantitativa)

Para evaluar el efecto de distintos tratamientos sobre la expresión del ARNm de MKP-1, se realizaron RT-PCR semicuantitativas. En ellas se amplifica un fragmento de 560 pb correspondiente al ARNm de MKP-1 en un número de ciclos tal que se encuentre en la fase exponencial de la amplificación y la técnica sea así sensible a variaciones en los niveles del transcripto. El número de ciclos utilizado para hacer a esta técnica semicuantitativa, fue optimizado para cada ADNc realizando una curva de número de ciclos (ver Resultados). Para ello, luego de realizar amplificaciones de una misma muestra con un mismo par de oligonucleótidos durante diferente número de ciclos, los productos fueron analizados en geles de agarosa con bromuro de etidio. Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas por densitometría, y se graficaron en función del número de ciclos. La fase geométrica de la PCR es el rango de ciclos donde la curva es lineal.

Para comparar las cantidades de los fragmentos analizados a partir de distintas muestras, se analizó la expresión del ARNm correspondiente a la proteína ribosomal L19 de cada una de ellas. Se utilizó el producto amplificado de L19 como control interno ya que la expresión de su ARNm se mantiene estable con los tratamientos.

Las condiciones generales de la reacción fueron: a) 5 minutos a 95°C, b) 30 segundos a 95°C, c) 30 segundos 56°C, d) 1 minuto a 72°C y e) 5 minutos a 72°C, con una repetición de 15, 20, 25, 30 y 35 ciclos desde el segundo hasta el cuarto paso. Luego se determinó el

número de ciclos óptimo para el transcrito de MKP-1 y de L19. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada transcrito se muestran en la tabla 2.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Amplicón	n° ciclos
MKP-1 directo	GAGCTGTGCAGCAAACAGTCC	52,6	560 pb	23
MKP-1 reverso	CCGGTGGCAAGTGAAACTCC	56		
L19 directo	GAAATCGCCATTGCCAACTC	54,5	505 pb	20
L19 reverso	TCTTAGACCTGCGAGCCTCA	52,6		

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR semicuantitativa. Se muestran sus secuencias y las correspondientes Tm. Para cada par de oligonucleótidos se indica el tamaño del fragmento que amplifican (amplicón) y el número de ciclos óptimo para la reacción.

- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real-time PCR)

El ANDc del gen que codifica para la proteína StAR (NM_011485.4) y el gen que codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) (NM_002046.3) fueron amplificados por PCR en tiempo real utilizando el reactivo SYBR Green Master Mix Reagent (Applied Biosystem) y un equipo ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Los oligonucleótidos (5' - 3') directos y reversos utilizados se muestran en la tabla 3. Cada oligonucleótido se utilizó a una concentración de 0,3 µM en cada reacción. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: a) 10 minutos a 95°C, b) 15 segundos a 95°C, c) 30 segundos 55°C y d) 30 segundos a 60°C, con una repetición de 40 ciclos desde el segundo hasta el cuarto paso. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Sequence Detection Software (Applied Biosystem, Version 1.3). La cuantificación de la expresión génica se calculó a partir de curvas estándar y cada muestra se normalizó con la expresión de GAPDH.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Amplicón
StAR directo	TTGGGCATACTCAACAACCA	51,2	480 pb
StAR reverso	CCTTGACATTTGGGTCCAC	51,6	
GAPDH directo	TGCACCACCAACTGCTTAGC	53,7	408 pb
GAPDH reverso	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	55	

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR semicuantitativa. Se muestran sus secuencias y las correspondientes Tm. Para cada par de oligonucleótidos se indica el tamaño del fragmento que amplifican (amplicón).

X. OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN DE MKP-1

- Obtención de los vectores de expresión pRc/CMV-MKP-1 sentido y antisentido

Se partió del plásmido pGEM[®]-T Easy conteniendo la secuencia de 1,7 kb de MKP-1 proveniente de la reacción de PCR. Se digirió 1 µg de plásmido con la enzima *EcoRI*. La utilización de una única enzima de restricción permite obtener, luego de la ligación al vector correspondiente, construcciones en donde el fragmento clonado puede estar en orientación sentido o antisentido. La digestión se realizó durante 3 horas a 15°C. El producto de la digestión fue analizado en un gel de agarosa con bromuro de etidio. El fragmento correspondiente al ADNc de MKP-1 se purificó del gel como se explicó anteriormente. El plásmido pRc/CMVi fue también digerido con la enzima *EcoRI* de manera de crear extremos compatibles. Luego se desfosforilaron sus extremos para evitar su recircularización. Posteriormente se ligaron el ADNc de MKP-1 y el plásmido desfosforilado siguiendo el mismo protocolo de digestión ya detallado. Se mantuvo una relación molar inserto:vector de 3:1. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-Blue. Se realizó luego el aislamiento y purificación del plásmido recombinante a mediana escala (MIDIPREP). Las construcciones obtenidas fueron verificadas por digestión con enzimas de restricción y secuenciación lo que permitió conocer la orientación del inserto.

- Obtención del vector de expresión p3XFLAG-MKP-1

Se partió del plásmido pGEM[®]-T Easy conteniendo la secuencia de 1,4 kb de MKP-1 proveniente de la reacción de PCR. Se digirió 1 µg de plásmido y del vector p3XFLAG-CMV-7.1 con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*. El clonado del fragmento se realiza en el mismo marco de lectura que la secuencia de aminoácidos (flag) que esta ubicado en el extremo 5' del vector para generar una proteína de fusión flag-MKP-1 con el flag en el extremo N-terminal de la misma. La proteína recombinante puede ser detectada por Western blot con un anticuerpo anti-flag. El protocolo de ligación, transformación de bacterias y purificación del plásmido fue similar al detallado anteriormente. La construcción obtenida fue verificada por digestión con enzimas de restricción y mediante secuenciación.

XI. OBTENCIÓN DE UN VECTOR DE EXPRESIÓN DE ARNs PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA DE MKP-1

Una estrategia utilizada para disminuir específicamente los niveles de la proteína MKP-1 fue la transfección de las células con el vector pSUPER.retro (OligoEngine), el cual dirige la síntesis intracelular de ARNs pequeños de interferencia (siRNA) bajo el control del promotor de la ARN H1 polimerasa III.

Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos de 19 pb cuya secuencia es idéntica a una región específica del ARNm de MKP-1 (Tabla 4). Cada oligonucleótido presenta las siguientes características: un sitio de corte para una enzima de restricción (*Bgl*II o *Hind*III), una secuencia en orientación sentido (correspondiente a una región del ADNm cuya expresión se quiere inhibir), una región de 9 nucleótidos ubicada en el centro y una secuencia en orientación antisentido complementaria a la secuencia sentido. Estas características le confieren al oligonucleótido la capacidad de formar una estructura secundaria o bucle.

En primera instancia, el par de oligonucleótidos (sentido y antisentido) son hibridados para luego ser clonados en el vector pSUPER.retro en los sitios de restricción de las enzimas *Bgl*II y *Hind*III. A continuación se realizó el corte del vector pSUPER.retro con las enzimas mencionadas, se purificó el vector linealizado a partir de un gel de agarosa y se clonó el fragmento de oligonucleótidos hibridados bajo el control del promotor de la ARN polimerasa III en este vector para generar la construcción pSUPER.retro-MKP-1 (siRNA-MKP-1).

Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')	Secuencia
MKP1siRNA directo	GATCCCCGCTCCACTCAAGTCTTC TTTCAAGAGAAAGAAGACTTGAGTGGAGCTTTT	490 - 508
MKP1siRNA reverso	AGCTTAAAAAGCTCCACTCAAGTCTTC TTTCTCTTGAAAAGAAGACTTGAGTGGAGCGGG	

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para generar siRNAs específicos de MKP-1 de ratón. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y su posición en el ARNm de MKP-1. En negrita se remarcan las secuencias sentido y antisentido involucradas en la formación del bucle.

El transcripto resultante del vector predice una forma de replegado sobre sí mismo con una estructura de bucle. El bucle del transcripto precursor es rápidamente clivado en la célula produciendo de esta manera el siRNA funcional. La transfección de las células con

esta construcción lleva a la degradación específica del ARNm de MKP-1. La construcción obtenida fue verificada por digestión con enzimas de restricción y mediante secuenciación.

XII. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las células fueron cultivadas a un 80% de confluencia en placas de 24 pocillos un día antes de la transfección. La transfección fue realizada con 0,8 µg de plásmido en medio Opti-MEM y 2 µl de reactivo Lipofectamina™ 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en 500 µl de medio sin antibióticos. Los plásmidos utilizados fueron: pRc/CMVi-MKP-1 sentido o antisentido, siRNA-MKP-1, p3xFLAG-MKP-1, o los vectores vacíos como control. Para los experimentos de análisis de la actividad de promotores, las células fueron cultivadas en placas de 48 pocillos y transfectadas con 0,05 µg del plásmido pGL3 conteniendo el ADNc de la luciferasa de luciérnaga (*Firefly luciferase*) bajo el control de los promotores de: STARD1 (pGL3-StAR [242]), o CYP11A1 (pGL3-CYP11A1 [243]) o NUR77 (pGL3-NUR77 [216]), junto con 0,35 µg del plásmido pRc/CMVi conteniendo el ADNc de MKP-1 en orientación sentido y antisentido o del siRNA de MKP-1 y con 5 ng del plásmido pRL (*Renilla luciferase*). Transcurridas 6 horas post-transfección, se cambió el medio de cultivo por medio sin suero y con antibióticos y las células fueron crecidas durante 24 horas más. Luego las células fueron estimuladas en un medio de cultivo libre de suero, para ser luego procesadas para la obtención del ARN o las proteínas. La eficiencia de transfección fue aproximadamente del 40% para ambas líneas, como se estimó por conteo de células fluorescentes transfectadas con el plásmido pRc/CMVi conteniendo la forma mejorada de la proteína fluorescente verde (EGFP).

XIII. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA

El análisis de la actividad de los promotores de los genes en estudio, se evaluó a partir de la actividad de la enzima luciferasa de luciérnaga (*Firefly luciferase*), cuya expresión esta bajo control de estos promotores. Las células fueron transfectadas como se comentó previamente con los plásmidos pGL3-StAR, pGL3-CYP11A1, pGL3-NUR77, junto con los vectores pRc/CMV-MKP-1 sentido o antisentido y con 5 ng del plásmido pRL, el cual contiene el gen de la *Renilla* luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo, como control de la transfección. Luego de la transfección, las células fueron estimuladas durante

distintos tiempos para evaluar el tiempo óptimo de estimulación de cada promotor. Para los promotores de StAR, CYP11A1 y NUR77 el tiempo de estimulación elegido fue de 6, 12 y 4 horas respectivamente. Luego del tratamiento, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 70 μ l de una solución de lisis (Passive Lysis Buffer 1x, Promega) durante 15 minutos con agitación a temperatura ambiente. Una alícuota de 2-5 μ l del lisado fue utilizada para determinar la actividad de luciferasa con el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega). Mediante este kit se determina la actividad de ambas luciferasas y se normaliza la actividad de la luciferasa de luciérnaga respecto de la actividad constitutiva de la luciferasa de *Renilla* y se expresa en unidades relativas. La detección de la actividad de ambas enzimas se realizó mediante un lector multiplaca Synergy™ HT (Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments).

XIV. INMUNOCITOQUÍMICA

Células crecidas en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina se lavaron una vez con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas con PBS e incubadas con solución de bloqueo (PBS conteniendo 1% de albúmina bovina y 0,3% Tritón X100) durante 1 hora a temperatura ambiente seguido por la incubación con anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína MKP-1 (anti-MKP-1), o el anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína flag-MKP-1 (anti-flag) o con suero preinmune (control) en cámara húmeda a 4°C durante 24 horas. La detección de los anticuerpos específicos se realizó con un anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo conjugado con el fluoróforo cy2 o con un anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con el fluoróforo cy3, para la detección del anticuerpo anti-KP-1 o anti-flag, respectivamente (Molecular Probes, Eugene, OR). Luego de los lavados correspondientes con PBS, los cubreobjetos fueron montados con reactivo FluorSave (Calbiochem, CA, USA).

Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio de epifluorescencia modelo Olympus BX50 acoplado a una cámara digital Cool/Snap Proof Color PM-c35 con el software correspondiente para el análisis de las imágenes (Dpto. de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina).

XV. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Finalizados los tratamientos de los cultivos celulares, la progesterona (P4) presente en el medio de cultivo fue valorada por radioinmunoanálisis. Para esto, alícuotas del medio de cultivo conteniendo los esteroides producidos fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con 100 µl de progesterona radioactiva (6000 cpm) y 100 µl de anticuerpo anti-progesterona en una dilución 1:1200 en PBS-gelatina 0,1%. La hormona libre se separó de la unida al anticuerpo mediante la incubación con 200 µl de carbón activado 0,625% P/V durante 7 min a 4°C y posterior centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron rápidamente transferidos a viales de conteo a los cuales se les agregó 1ml de solución centelladora Optiphase® para realizar las mediciones en un contador β de centelleo líquido. Los datos se expresan como P4 producida (ng/ml).

XVI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como la media ± D.E. La significancia estadística fue evaluada utilizando ANOVA, seguida del test de Tukey. Se consideró significativa $P < 0,05$.

RESULTADOS

I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MKP-1 POR ACCIÓN HORMONAL EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

I.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MKP-1 POR LH/hCG

Como mencionamos en la introducción, el mecanismo de acción de LH y ACTH promueve la inducción de una proteína cuya actividad resulta esencial para la esteroidogénesis, la proteína StAR. También mencionamos que estas hormonas disparan la activación de las quinasas PKA y ERK1/2. Es conocido que la actividad de ERK1/2 participa tanto en la inducción como en la activación de la proteína StAR. Los estudios más recientes en relación al mecanismo de acción de LH/ACTH intentan responder el interrogante de cómo las hormonas esteroidogénicas disparan el cierre de aquellos mecanismos que son iniciados en la primera fase de su acción.

En este contexto, una serie de trabajos, incluidos los nuestros, han sido encarados con el fin de establecer si las hormonas esteroidogénicas regulan la actividad de las proteínas fosfatasas que “cierran” el circuito de acción de las MAP quinasas: las MKPs. Como resultado de estos estudios actualmente se conoce que ACTH y Angiotensina II regulan la expresión de MKP-1 en células adrenocorticales [107, 231, 232]. En base a estos conocimientos previos, en este trabajo de Tesis nos propusimos analizar si la expresión de MKP-1 también es regulada por acción hormonal en otro tipo de células esteroidogénicas, las células de Leydig MA-10. Nuestra hipótesis acerca de la regulación de MKP-1 por LH en células de Leydig se basa en el hecho de que, en estudios previos, observamos un incremento mediado por AMPc de los niveles del ARNm de MKP-1 en este tipo celular [230].

Para evaluar la regulación transcripcional de MKP-1 por acción hormonal, los cultivos de células de Leydig de la línea MA-10 fueron privados de suero durante 24 horas. Luego las células fueron incubadas en presencia o en ausencia de la hormona hCG (20 ng/ml) o de un derivado permeable del segundo mensajero de la acción hormonal, el 8Br-AMPc (0,5 mM), durante distintos tiempos. A continuación, se extrajo y purificó el ARN total de las células y se evaluó el nivel del ARNm de MKP-1 mediante PCR semicuantitativa.

Utilizando oligonucleótidos específicos se amplificó un fragmento de 560 pb correspondiente al ARNm de MKP-1. Como control de la cantidad de ARN utilizado en cada reacción, se realizó en paralelo la amplificación del transcripto de la proteína ribosomal L19, cuyos niveles no se modifican por el tratamiento hormonal (*housekeeping gene*).

Para validar la técnica de PCR semicuantitativa, se determinó el número de ciclos de amplificación óptimo tanto para el ARNm de MKP-1 como para el de L19. Cabe destacar que para que esta técnica sea realmente semicuantitativa el número de ciclos de amplificación óptimo debe estar en el rango de amplificación exponencial de la reacción de PCR (Figura 11).

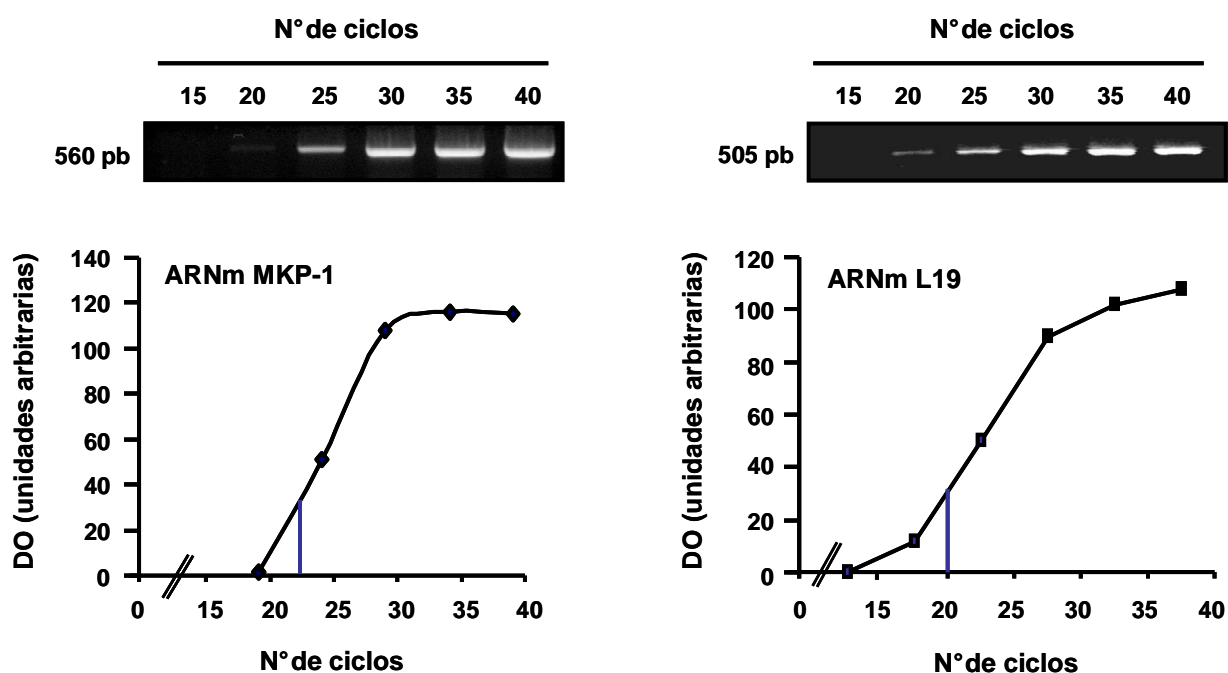


Figura 11: Determinación del número de ciclos de amplificación óptimo para el análisis del ARNm de MKP-1 por PCR semicuantitativa. A partir de ARN total de células MA-10 se realizaron las reacciones de RT y PCR utilizando oligonucleótidos específicos. La amplificación por PCR del ADNc de MKP-1 y L19 se realizó utilizando el número de ciclos que se indica en la figura. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa con bromuro de etidio. En el panel superior se muestra la imagen correspondiente a un gel de agarosa representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de cada transcripto evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos se expresan en unidades arbitrarias.

Del gráfico de la figura 11, se determinó que el número de ciclos de amplificación óptimo para el ARNm de MKP-1 fue 23, mientras que para el ARNm de L19 fue 20. Una vez determinadas las condiciones óptimas de amplificación para cada transcripto se procedió a evaluar la regulación transcripcional de MKP-1 por acción hormonal. Luego del tratamiento de las células con el protocolo descrito en el párrafo anterior, se aisló el ARN total y seguidamente se llevaron a cabo las reacciones de RT y PCR semicuantitativa utilizando las condiciones mencionadas anteriormente. Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etido. Luego, las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría.

Los estudios descritos mostraron que en células de Leydig MA-10 la hormona hCG también promueve la inducción de MKP-1, igual que lo observado en células adrenocorticales por acción de ACTH (Figura 12). La cinética de inducción de MKP-1 mostró un incremento del ARNm a los 15 minutos de estímulo hormonal (hCG, 20 ng/ml), alcanzando un máximo a los 30 minutos, el cual disminuye a los valores basales luego de 2 horas (Figura 12, panel A). Similares resultados se observaron cuando las células fueron estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) (Figura 12, panel B), sin embargo, en este caso el incremento del ARNm de MKP-1 fue mayor al promovido con hCG, y el descenso de los niveles del mensajero luego del máximo de estimulación sigue una cinética más lenta respecto a la que se observa con la hormona.

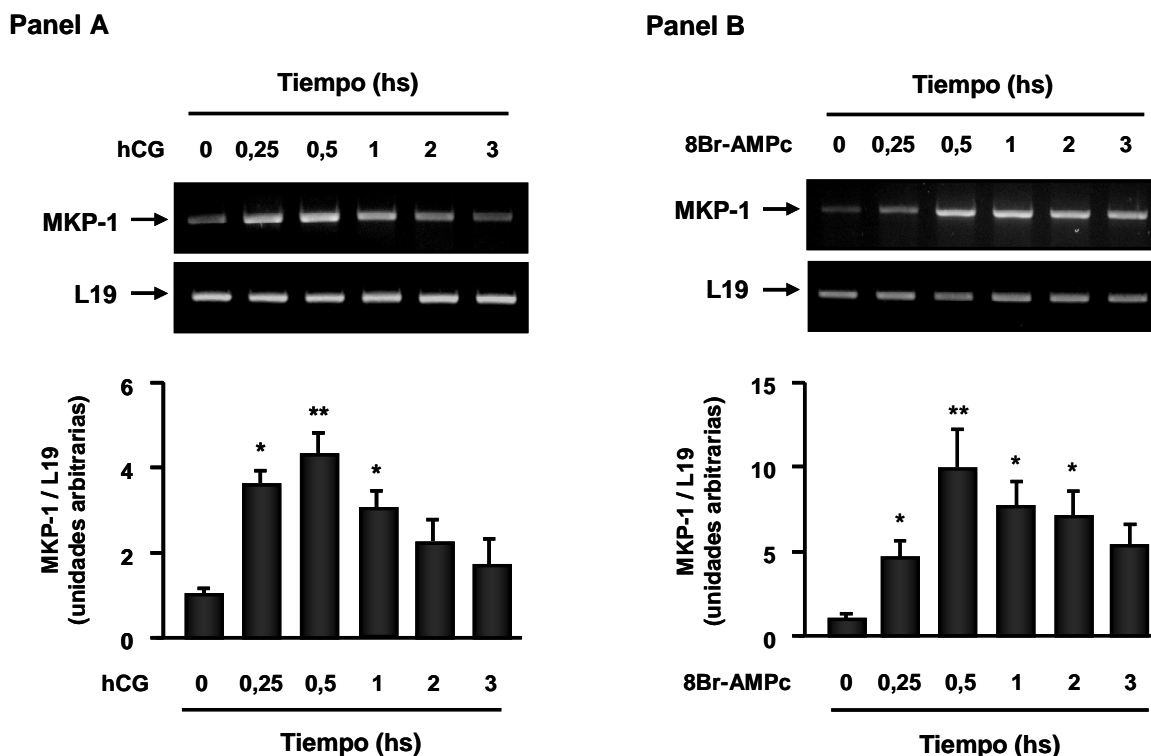


Figura 12. Efecto de hCG y AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con hCG (20 ng/ml) (**Panel A**) u 8Br-AMPc (0,5 mM) (**Panel B**) durante los tiempos indicados. Se evaluó el nivel de expresión del ARNm de MKP-1 y de L19 mediante PCR semicuantitativa. En el panel superior se muestra la imagen correspondiente a un gel de agarosa representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles del ARNm de MKP-1, normalizados contra la señal del ARNm de L19, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos. *, $P < 0,05$ y **, $P < 0,01$ vs. células controles, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Con el fin de determinar si el incremento del ARNm de MKP-1 por hCG/AMPc involucra la síntesis *de novo* de este transcrito, evaluamos en qué grado un inhibidor de la transcripción (actinomicina D) modifica el efecto del AMPc.

Determinamos que el aumento en los niveles del mensajero de MKP-1 alcanzado mediante la incubación durante 30 minutos con 8Br-AMPc se anula cuando las células se preincubaban con actinomicina D, lo cual sugiere que el efecto del AMPc no involucra la estabilización del mensajero pre-existente sino que se debe a la síntesis *de novo* del mismo (Figura 13).

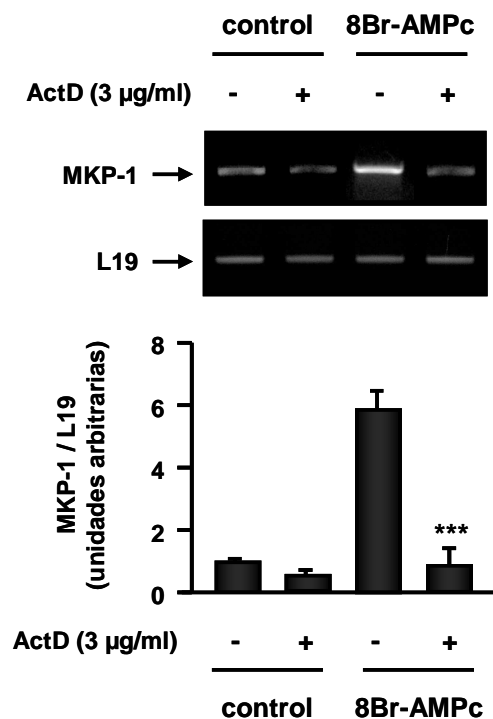


Figura 13 Efecto de la actinomicina D sobre los niveles del ARNm de MKP-1 en células de Leydig MA-10 estimuladas con AMPc. Las células MA-10 fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 30 minutos, en presencia o ausencia de actinomicina D (3 µg/ml). Se evaluó el nivel de expresión del ARNm de MKP-1 y de L19 mediante PCR semicuantitativa. En el panel superior se muestra la imagen correspondiente a un gel de agarosa representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles del ARNm de MKP-1, normalizados contra la señal del ARNm de L19, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos. ***, $P < 0,001$ vs. células estimuladas en ausencia de actinomicina D, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Para establecer si la inducción de MKP-1 disparada 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 esta quinasa. Para esto se utilizó el compuesto PD98059 (50 µM), un inhibidor la quinasa río arriba de ERK1/2, MEK1/2. Luego se analizaron los niveles del ARNm de MKP-1 de células estimuladas con 8Br-AMPc en presencia o ausencia de este compuesto.

El análisis por PCR semicuantitativa 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 14), aún cuando este compuesto fue capaz de impedir la activación de ERK1/2 (datos no mostrados). Este hecho sugiere que el mecanismo por el cual el AMPc dispara la inducción de MKP-1 no involucra la actividad de ERK1/2 como ocurre en otros sistemas.

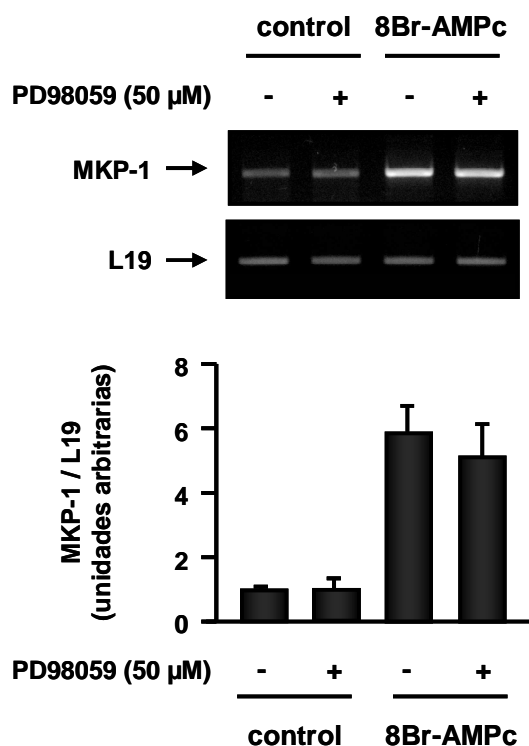


Figura 14. Efecto de ERK1/2 sobre los niveles del ARNm de MKP-1 en células de Leydig MA-10 estimuladas con AMPc. Las células MA-10 fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 30 minutos, en presencia o ausencia de PD98059 (50 μM). Se evaluó el nivel de expresión del ARNm de MKP-1 y de L19 mediante PCR semicuantitativa. En el panel superior se muestra la imagen correspondiente a un gel de agarosa representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles del ARNm de MKP-1, normalizados contra la señal del ARNm de L19, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos representan el promedio ± D.E. de tres experimentos.

I.2. EFECTO DE hCG SOBRE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA MKP-1

A continuación analizamos los niveles de la proteína MKP-1 mediante Western blot en células de Leydig estimuladas con la hormona hCG durante distintos tiempos. Se realizó un fraccionamiento subcelular para evaluar la presencia de MKP-1 en el núcleo.

El análisis de las proteínas nucleares mostró que en ausencia del estímulo hormonal la proteína MKP-1 no es detectada. Sin embargo luego de 30 minutos de estimulación con hCG los niveles de la proteína se incrementan, alcanzando un máximo aproximadamente a las 2 horas (Figura 15).

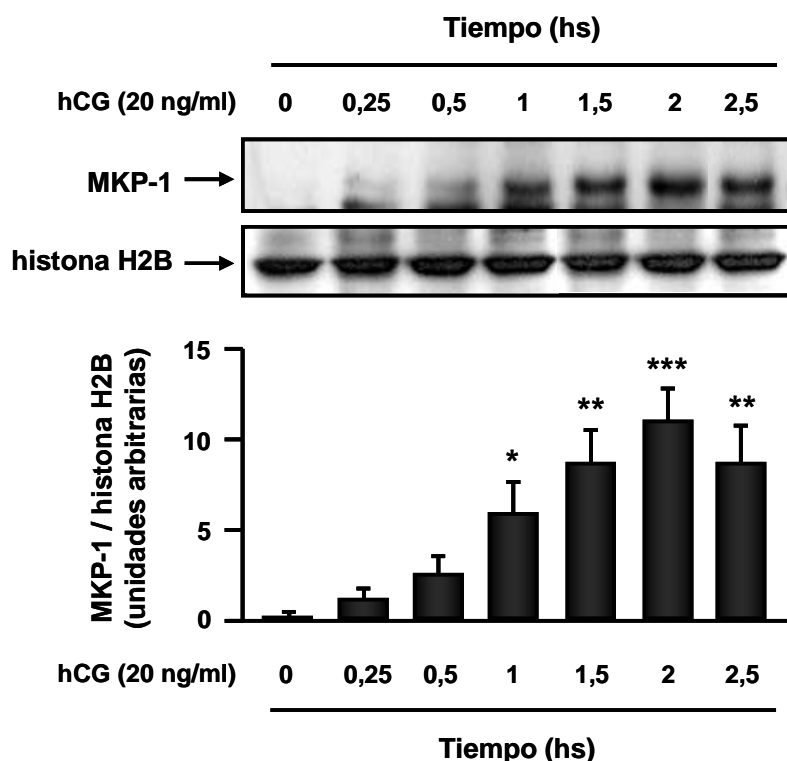


Figura 15. Efecto de hCG sobre los niveles de la proteína MKP-1 en la fracción nuclear de células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con hCG (20 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se realizó un fraccionamiento subcelular y las proteínas nucleares se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-MKP-1. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína histona H2B, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs. células controles, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Dado que un trabajo demuestra la presencia de MKP-1 en mitocondrias de células de tejido nervioso [95], nos interesó conocer si en células de Leydig también se detectaba la proteína MKP-1 en esta organela. El análisis por Western blot de las proteínas mitocondriales no reveló la presencia de MKP-1 en condiciones basales pero sí luego de 30 minutos de estimulación hormonal. Al igual que lo observado en la fracción nuclear, los

niveles de la proteína se incrementan conforme transcurre el tiempo de estimulación con la hormona durante los tiempos analizados (Figura 16).

Este resultado es un fuerte indicio de la presencia de MKP-1 en una organela que no es clásicamente considerada como sitio de localización de esta proteína. La detección de MKP-1 en mitocondria constituyó un hallazgo novedoso y es consistente con la presencia y función de ERK1/2 en mitocondrias de células esteroidogénicas [50].

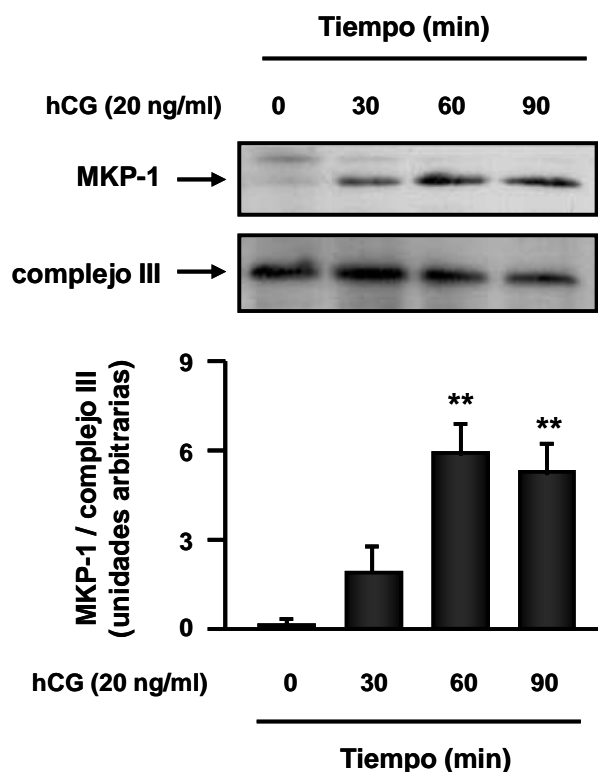


Figura 16. Efecto de hCG sobre los niveles de la proteína MKP-1 en la fracción mitocondrial de células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con hCG (20 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se realizó un fraccionamiento subcelular y las proteínas mitocondriales se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-MKP-1. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína del complejo III mitocondrial, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. **, $P < 0,01$ vs. células controles, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

I.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA MKP-1

Con el fin de determinar la localización subcelular de MKP-1 en células de Leydig se realizaron estudios de inmunocitoquímica. Las células de Leydig MA-10 fueron cultivadas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina, luego privadas de suero por 24 horas e incubadas en presencia o ausencia de hCG durante 90 minutos. Luego del tratamiento, las células fueron fijadas y tratadas en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos para la visualización de las mismas mediante microscopía de fluorescencia (Figura 17).

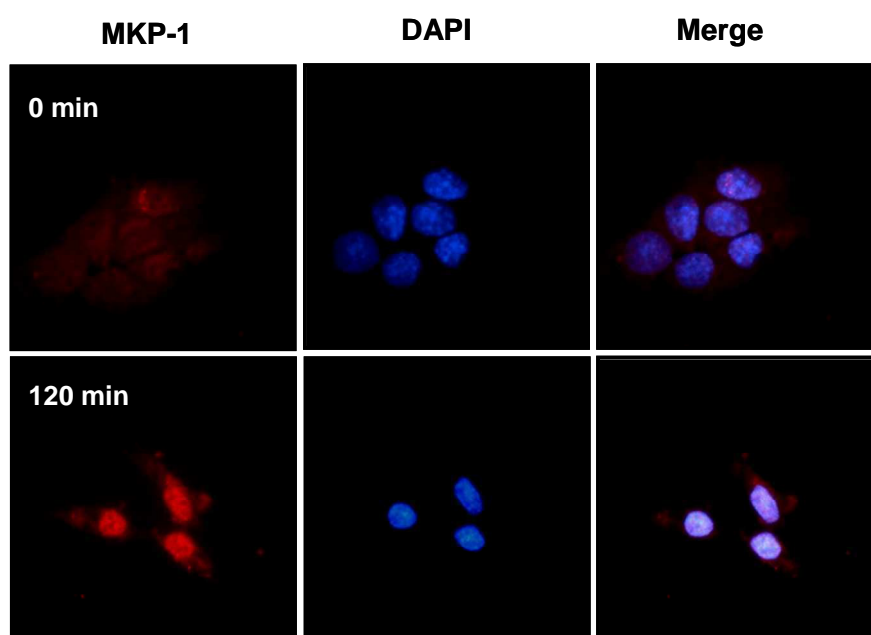


Figura 17. Análisis de la distribución subcelular de la proteína MKP-1 en células de Leydig MA-10 por microscopía de fluorescencia. Las células MA-10 se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 15.000 células/cm². Al día siguiente fueron privadas de suero por 24 horas y luego incubadas con hCG (20 ng/ml) durante 90 minutos. A continuación las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo específico anti-MKP-1 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). La inmunomarcación fue analizada con un microscopio de fluorescencia. La superposición de ambos colores se observa en celeste (*merge*). La figura muestra una imagen representativa de 12 observaciones de 2 experimentos independientes con similares resultados.

Se pudo observar una señal de mayor intensidad en las células estimuladas con la hormona (hCG 20 ng/ml) respecto de las células controles, lo cual es consistente con los resultados que demuestran que la hormona incrementa los niveles de expresión de MKP-1.

Además pudimos corroborar que, como está descrito en la bibliografía, esta proteína se localiza principalmente en el núcleo, aunque una porción minoritaria también es detectada fuera de esta organela (Figura 17). La señal de MKP-1 fuera del núcleo podría deberse a la presencia de esta proteína en mitocondrias en concordancia con lo observado por Western blot en la figura anterior (Figura 16).

En conjunto estos resultados demuestran que en células de Leydig de la línea MA-10, las hormonas LH/hCG, a través de un mecanismo mediado en parte por el sistema AMPc/PKA, promueven el incremento tanto de los niveles del ARNm como de la proteína MKP-1, la cual se localiza principalmente en el núcleo y en menor proporción en las mitocondrias.

I.4. REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE MKP-1 POR ACCIÓN HORMONAL

I.4. a. Estrategia utilizada para la sobre-expresión transitoria de MKP-1

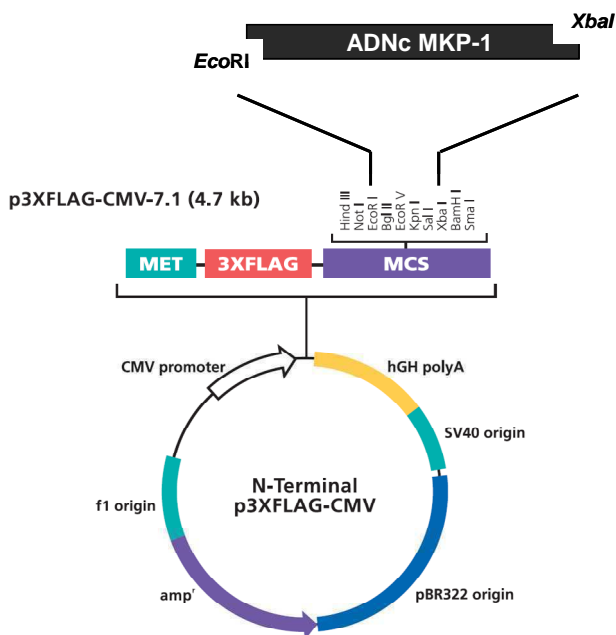
Otro objetivo de nuestro trabajo fue determinar si en células de Leydig la hormona trófica correspondiente regula los niveles de la proteína MKP-1 por una acción a nivel post-traducciona. Para esto se utilizó como estrategia la transfección transitoria de las células con un vector conteniendo el ADNc de MKP-1 bajo el control de un promotor constitutivo. Esta estrategia nos permite evaluar la regulación de los niveles de la proteína MKP-1 independizándonos de la regulación a nivel transcripcional.

Con el fin de estudiar la regulación post-traducciona de MKP-1, se realizó el clonado del ADNc de MKP-1 en el vector p3XFLAG-CMV-7.1. Este vector tiene la propiedad de generar una proteína de fusión con un FLAG en el extremo amino terminal de la misma, permitiendo de esta forma detectar eficientemente la proteína recombinante mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico (anti-flag). Para esto se extrajo el ARN total de células de Leydig MA-10 cultivadas en presencia de suero (para asegurar la presencia del ARNm correspondiente a MKP-1, en este caso inducido por factores presentes en el suero). A partir de este ARN se realizó una reacción de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar el ADNc de la MKP-1 (fragmento de 1,4 kb). Este fragmento fue clonado en los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* del vector mencionado (Figura 18) y se

obtuvo la construcción necesaria para la sobre-expresión de la proteína de fusión flag-MKP-1, como se describe en Materiales y Métodos. Esta construcción fue analizada mediante un mapa de restricción y secuenciación.

La transfección de las células se realizó utilizando el reactivo Lipofectamina 2000. El protocolo de transfección involucra un primer paso de incubación de las células con la mezcla de Lipofectamina/ADN en un medio libre de antibióticos durante 6 horas. Luego de 24 horas de incubación las células están en condiciones de ser utilizadas en los diferentes experimentos. Con este protocolo se obtiene una eficiencia de transfección del 40% aproximadamente, determinada a partir de la transfección de las células con el vector pRc/CMV-EGFP, el cual sobre-expresa la proteína EGFP y posterior análisis de las células positivas mediante microscopía de fluorescencia.

Panel A



Panel B

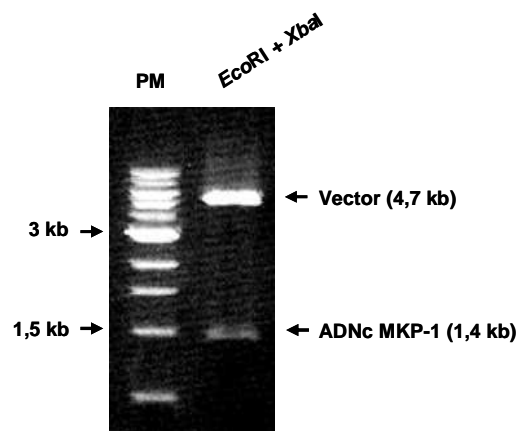


Figura 18. Esquema del vector utilizado para la sobre-expresión de la proteína flag-MKP-1 en células esteroideogénicas. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar mediante RT-PCR el ADNc del gen MKP-1 de ratón a partir del sitio de inicio de la traducción. El producto de la reacción de PCR (1,4 kb) fue clonado en los sitios *EcoRI* y *XbaI* del vector de expresión p3XFLAG-CMV-7.1 para generar la proteína de fusión flag-MKP-1 (**Panel A**). Se corroboró la presencia del inserto de 1,4 kb en el vector mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis en geles de agarosa con bromuro de etidio (**Panel B**). PM: marcadores de peso molecular.

Una vez obtenida la construcción pFLAG-MKP-1, se transfectaron transitoriamente cultivos de células de Leydig MA-10 con este vector. Luego de 24 horas de incubación, las células fueron privadas de suero por 24 horas y luego incubadas en presencia o ausencia de 8Br-AMPC durante 90 minutos. A continuación se analizaron los niveles de MKP-1 para evaluar la funcionalidad del vector diseñado.

Pudimos observar que las células transfectadas transitoriamente con el vector pFLAG-MKP-1 presentaron un incremento importante en la expresión de la proteína flag-MKP-1 respecto de la expresión de la proteína endógena, evidenciado por Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-MKP-1 (Figura 19). En el Western blot observamos la diferencia en el peso molecular de la proteína recombinante flag-MKP-1 respecto de la proteína endógena (42 kDa, que corresponde a los 40 kDa de MKP-1 más 2 kDa correspondientes al flag).

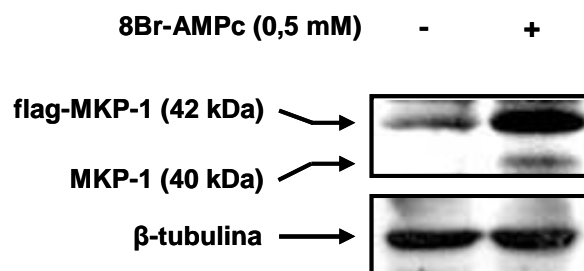


Figura 19. Sobre-expresión de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron privadas de suero durante 24 horas y luego incubadas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante 90 minutos. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-MKP-1 o anti-β-tubulina como control de carga. La figura muestra un experimento representativo repetido al menos tres veces con similares resultados.

Como se observa en la figura 19, los niveles de la proteína flag-MKP-1 cuya expresión está bajo control de un promotor constitutivo, aumentaron en respuesta al tratamiento con el AMPC, sugiriendo que los niveles de la proteína también son regulados por el segundo mensajero 8Br-AMPC. Este tema se analizará en detalle en el punto I.4.d.

I.4. b. Localización subcelular de la proteína flag-MKP-1

A continuación, se analizó la localización subcelular de la proteína recombinante flag-MKP-1 mediante inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo específico anti-flag. Se observó que en las células sin estimular, la proteína flag-MKP-1 se localiza predominantemente en el citoplasma. Por el contrario, luego del estímulo con la hormona (hCG, 90 minutos), la proteína presenta fundamentalmente localización nuclear (Figura 20).

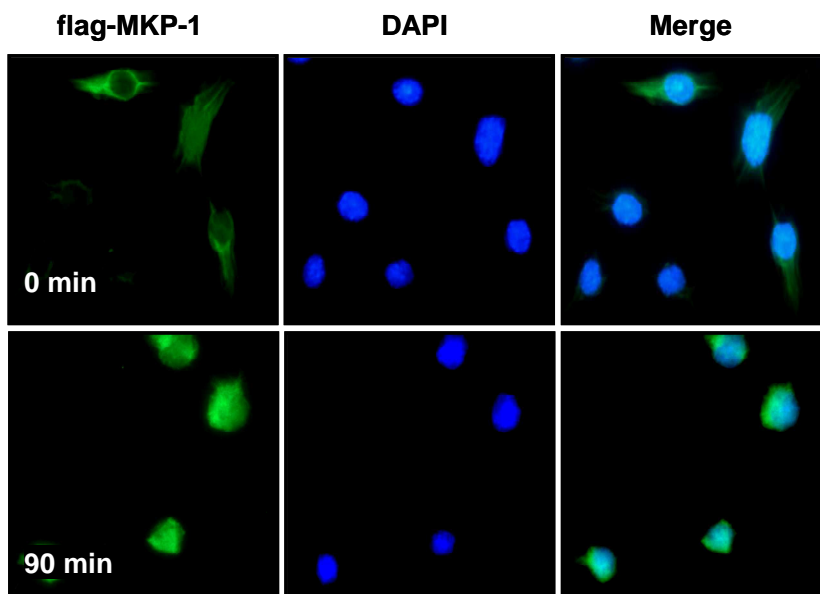


Figura 20. Análisis de la distribución subcelular de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10 por microscopía de fluorescencia. Las células MA-10 se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 15.000 células/cm². Al día siguiente fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1 y luego deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas con hCG (20 ng/ml) durante 90 minutos. A continuación las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo específico anti-flag (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). La inmunomarcación fue analizada con un microscopio de fluorescencia. La superposición de ambos colores se observa en celeste (*merge*). La figura muestra una imagen representativa de 12 observaciones de 2 experimentos independientes con similares resultados.

Para profundizar más el análisis de la localización subcelular de la proteína recombinante flag-MKP-1, se realizó un fraccionamiento subcelular y posterior análisis de los niveles de la misma por Western blot. En condiciones basales detectamos la presencia de la proteína flag-MKP-1 no sólo en las fracciones nuclear y citosólica sino también en la fracción

mitocondrial. También observamos que frente al estímulo hormonal los niveles de la proteína aumentan notablemente en las fracciones nuclear y mitocondrial (Figura 21).

Estos resultados están en línea con los mostrados anteriormente y refuerzan la idea de un posible rol funcional de esta fosfatasa en ambos compartimentos celulares y no un rol exclusivamente nuclear como se postula.

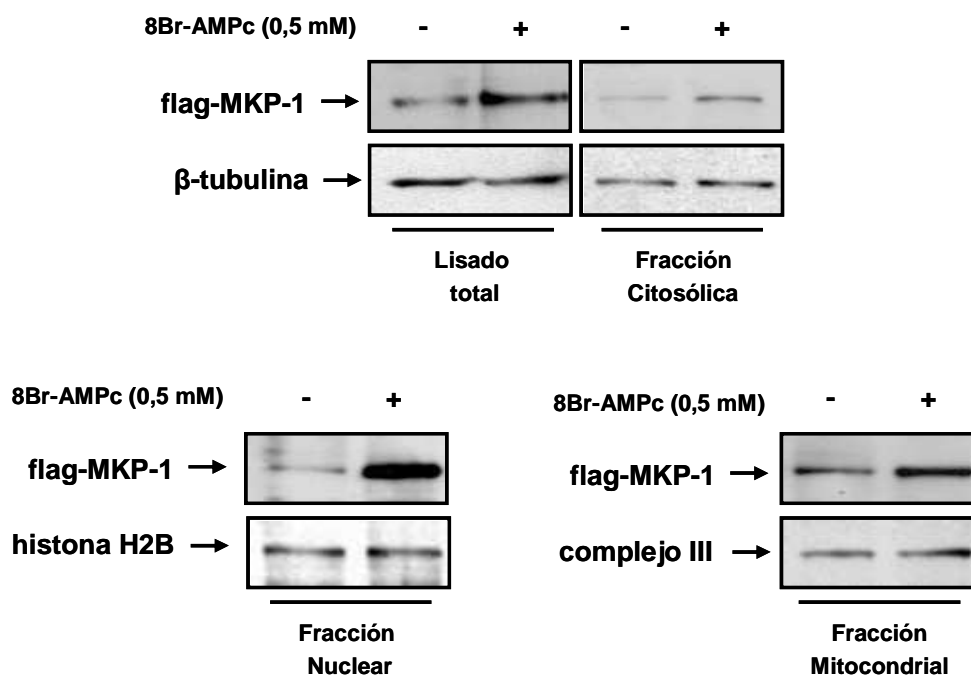


Figura 21. Análisis de la distribución subcelular de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10 por Western blot. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego incubadas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 90 minutos. Se realizó un fraccionamiento subcelular y las proteínas se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag o anti-β-tubulina o anti-histona H2B o anti-complejo III, según la fracción analizada, como controles de carga. La figura muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos tres veces con similares resultados.

Una vez corroborado que la transfección con el vector obtenido, pFLAG-MKP-1, aumenta los niveles de la proteína MKP-1 y que frente al estímulo hormonal esta proteína transloca al núcleo y a las mitocondrias, al igual que lo observado con la proteína endógena, comenzamos con los estudios sobre la regulación post-traduccional de esta proteína.

I.4. c. Efecto de la inhibición del proteasoma sobre los niveles de MKP-1

Conociendo que en otros tipos celulares la degradación de MKP-1 ocurre por acción del proteasoma [108, 113], evaluamos el efecto de la inhibición de este complejo y también la inhibición de otro tipo de proteasas como serina-proteasas y cisteina-proteasas, sobre los niveles de MKP-1 en células MA-10. Con este fin las células fueron transfectadas transitoriamente con el vector pFLAG-MKP-1. Luego de 24 horas de incubación, las células fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego incubadas durante 2 horas en presencia o ausencia MG-132, un conocido inhibidor del proteosoma, TLCK, un inhibidor de serina-proteasas y del inhibidor de calpaína I, una cisteina-proteasa. A continuación se analizó el nivel de la proteína flag-MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti-flag.

Observamos que los niveles de la proteína flag-MKP-1 se incrementan notablemente en presencia del MG-132, mientras que no se observa un aumento significativo de la proteína en presencia de los demás inhibidores (Figura 22).

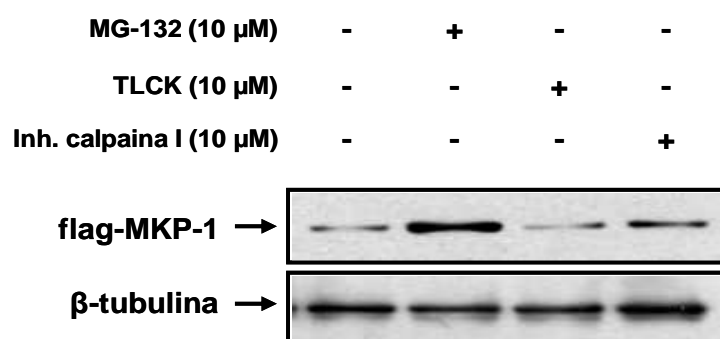


Figura 22. Efecto de inhibidores de proteasas sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas con MG-132 (10 μ M), o TLCK (10 μ M), o el inhibidor de calpaina I (10 μ M), durante 2 horas. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag. La figura muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos tres veces con similares resultados.

A continuación evaluamos el efecto de la incubación con MG-132 durante distintos tiempos sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1. La incubación de las células con este

compuesto durante 1 hora fue suficiente para acumular la proteína en una magnitud superior a la observada en las células controles (Figura 23).

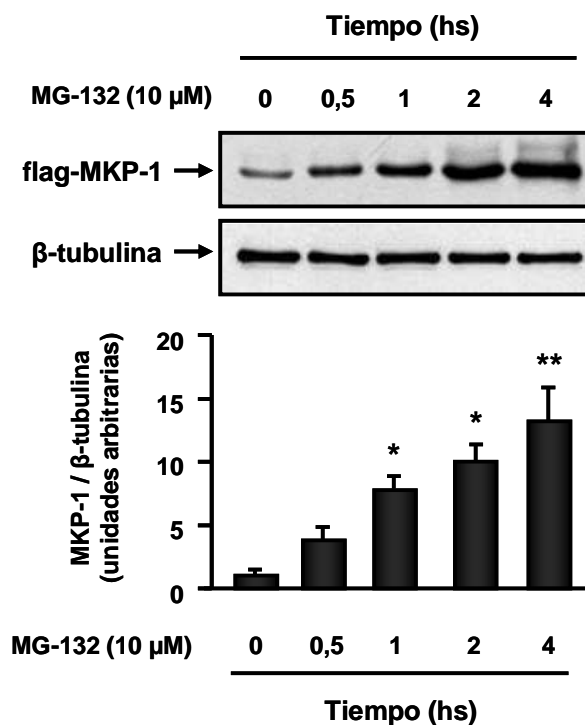


Figura 23. Efecto del inhibidor del proteasoma MG-132 sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas con MG-132 (10 μ M) durante los tiempos indicados. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína β -tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ vs. células controles, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y que la degradación de proteínas mediante el sistema enzimático del proteasoma involucra la ubiquitinación del sustrato, analizamos la ubiquitinación de MKP-1 mediante Western blot con un anticuerpo específico anti-ubiquitina. Observamos que la incubación de las células durante 2 horas con MG-132 incrementa los niveles de la proteína flag-MKP-1, según el análisis por Western blot con el anticuerpo anti-flag, y también el grado de ubiquitinación de la misma (Figura 24). Estos

resultados sugieren que el mecanismo principal de degradación de la proteína MKP-1 en células de Leydig MA-10 ocurre a través del sistema ubiquitina-proteasoma.

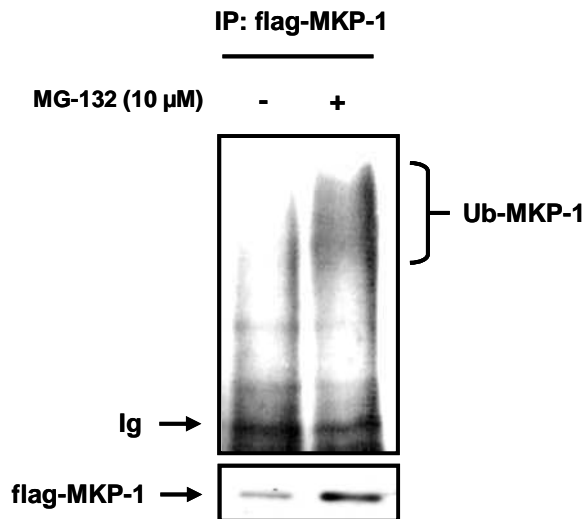


Figura 24. Efecto del inhibidor del proteasoma MG-132 sobre el grado de ubiquitinación de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas con MG-132 (10 μ M) durante 2 horas. Se inmunoprecipitó la proteína flag-MKP-1 y se evaluó el grado de ubiquitinación de la misma mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-ubiquitina. En el panel inferior se muestran los niveles de la proteína flag-MKP-1 evaluados por Western blot utilizando un anticuerpo anti-flag. La figura muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos dos veces con similares resultados.

I.4. d. Efecto de hCG sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1

En experimentos preliminares observamos que los niveles de expresión de la proteína recombinante flag-MKP-1 se incrementaron por estimulación de las células con 8Br-AMPC. Estos resultados sugerían que la estimulación con el análogo del segundo mensajero podría estar promoviendo alguna modificación sobre la proteína que justificara el aumento observado de los niveles de la misma. Por otra parte, habiendo establecido que en células MA-10 el sistema ubiquitina-proteasoma participa en la regulación de los niveles de MKP-1, postulamos que el efecto del AMPC sobre los niveles de la proteína recombinante involucra una modificación post-traducciona que interfiere con la degradación proteasomal.

En base a los antecedentes descriptos y a la hipótesis que surge de los mismos nos planteamos determinar si hCG/AMPC regula los niveles de MKP-1 por una acción a nivel post-traducciona que afecte su vida media. Para esto estudiamos en células transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1 el efecto del estímulo hormonal sobre los niveles de la proteína. Observamos, en células MA-10, que hCG incrementa los niveles de la proteína flag-MKP-1 conforme transcurre el tiempo de estimulación. El efecto máximo, de aproximadamente 15 veces de incremento respecto del control (células transfectadas no estimuladas), se detectó luego de 2 horas de estimulación (Figura 25, panel A). Similares resultados se obtuvieron incubando a las células con 8Br-AMPC (0,5 mM) (Figura 25, panel B).

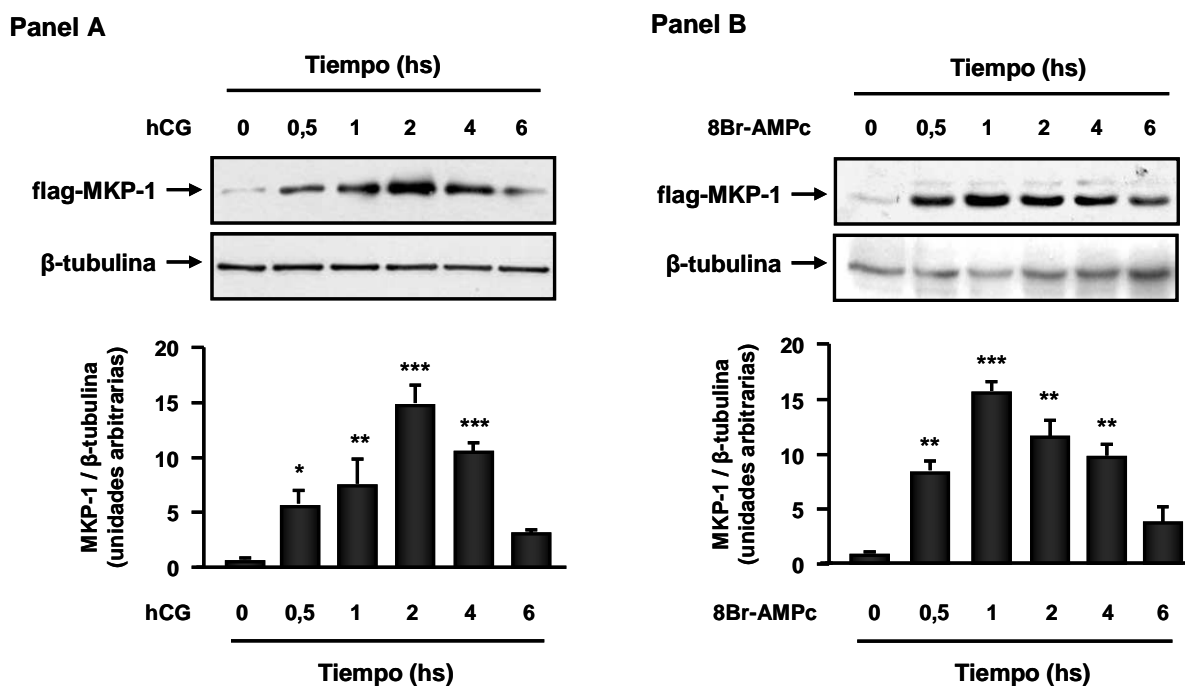


Figura 25. Efecto de hCG y AMPc sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con hCG (20 ng/ml) (**Panel A**) u 8Br-AMPC (0,5 mM) (**Panel B**) durante los tiempos indicados. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína β -tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs. células controles, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Como la expresión de la proteína flag-MKP-1 está bajo el control de un promotor constitutivo, el aumento en los niveles de esta proteína por el estímulo hormonal no es una consecuencia de la acción hormonal sobre la transcripción del gen. Por lo tanto los resultados descritos demuestran que la hormona hCG, a través del segundo mensajero AMPc, promueve la estabilización de la proteína.

Demostramos en la sección anterior que la proteína flag-MKP-1 está presente tanto en el núcleo como en las mitocondrias. Estos conocimientos más el hecho de que hCG y AMPc promueven un incremento en los niveles de la proteína en lisados celulares, motivaron nuestro interés en evaluar si este efecto ocurre en ambas organelas. Para esto las células fueron estimuladas durante 30 y 90 minutos con 8Br-AMPc y los niveles de MKP-1 fueron evaluados luego de un fraccionamiento subcelular mediante Western blot. Al igual que lo observado en los lisados celulares totales, el 8Br-AMPc incrementa los niveles de la proteína flag-MKP-1 tanto en la fracción nuclear como mitocondrial (Figura 26). Como control de carga de cada fracción analizada, se evaluó el nivel de las proteínas histona H2B y una subunidad del complejo III mitocondrial, en la fracción nuclear y mitocondrial, respectivamente.

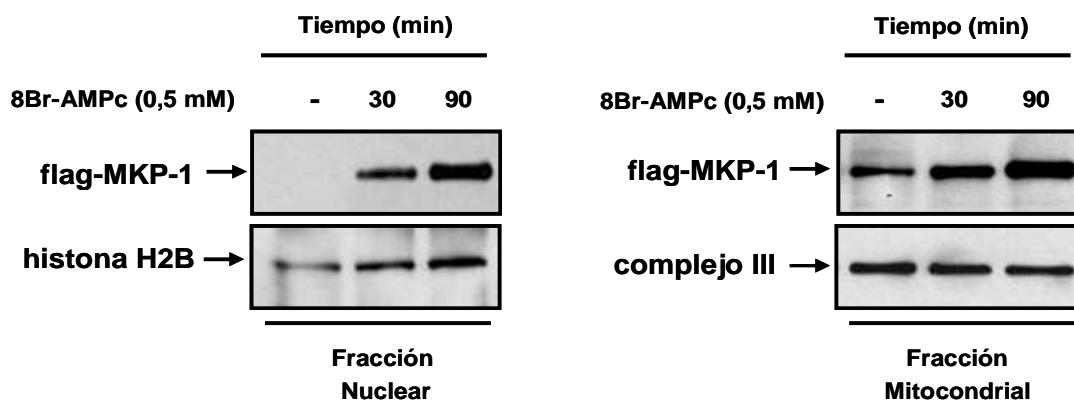


Figura 26. Efecto de AMPc sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en las fracciones nuclear y mitocondrial de células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego incubadas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 30 y 90 minutos. Se realizó un fraccionamiento subcelular y las proteínas se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag o anti-histona H2B o anti-complejo III, como controles de carga. La figura muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos dos veces con similares resultados.

En otros experimentos estudiamos el efecto del MG-132 sobre la cinética de acumulación de la proteína flag-MKP-1 inducida por AMPc. Con este propósito analizamos la acumulación de la proteína flag-MKP-1 en células que fueron estimuladas con 8Br-AMPc en presencia o ausencia del MG-132. Observamos que en ausencia del inhibidor del proteasoma, conforme progresa el tiempo de estimulación con el segundo mensajero, los niveles de la proteína se incrementan hasta alcanzar un máximo a la hora de estimulación y luego disminuyen. En cambio, al evaluar los niveles de la proteína correspondiente a células estimuladas con 8Br-AMPc en presencia de MG-132, se detecta un incremento constante durante todo el período analizado (Figura 27).

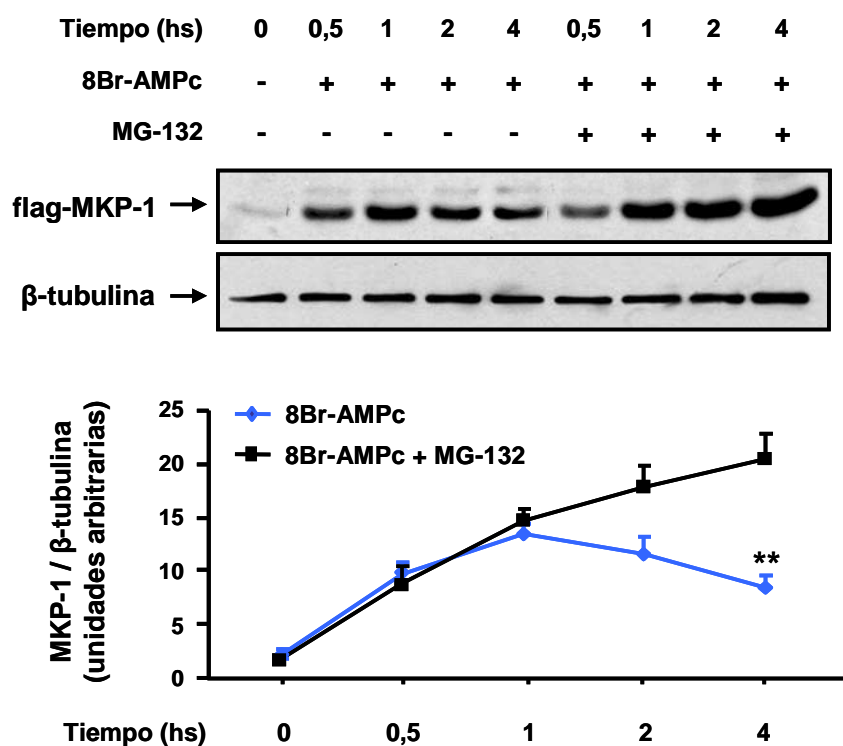


Figura 27. Efecto de AMPc y MG-132 sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas en presencia o ausencia de 8Br-AMPc (0,5 mM) con o sin MG-132 (10 μ M) durante los tiempos indicados. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína β -tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. **, P < 0,01; vs. células estimuladas en presencia de MG-132, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Estas observaciones son compatibles con un modelo en el cual el AMPc induce una modificación post-traducciona que conduce a la estabilización de MKP-1 al impedir su degradación por el proteasoma.

El conjunto de los resultados presentados indica que en células de Leydig la hormona trófica correspondiente ejerce, mediante un mecanismo dependiente de PKA, una regulación a nivel post-traducciona que conduce a la acumulación de MKP-1 en el núcleo y en las mitocondrias.

I.4. d. Participación de PKA y ERK1/2 en la regulación hormonal de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig

Dado que el mecanismo de acción de LH involucra la activación de las quinasas PKA y ERK1/2, seguidamente analizamos la participación de estas quinasas en el efecto estabilizador de hCG/AMPc sobre los niveles de MKP-1 en células de Leydig MA-10. El análisis de flag-MKP-1 por Western blot mostró que la preincubación con H89, un inhibidor específico de PKA, anula completamente el efecto de la hormona o del segundo mensajero (Figura 28). En contraste, el bloqueo de la activación de ERK1/2 mediada por hCG/AMPc con el compuesto PD98059 afecta sólo parcialmente la acumulación de MKP-1 (Figura 28). Estos resultados demuestran que, aunque con diferente relevancia, ambas quinasas participan en el proceso de estabilización de MKP-1 por estímulo hormonal.

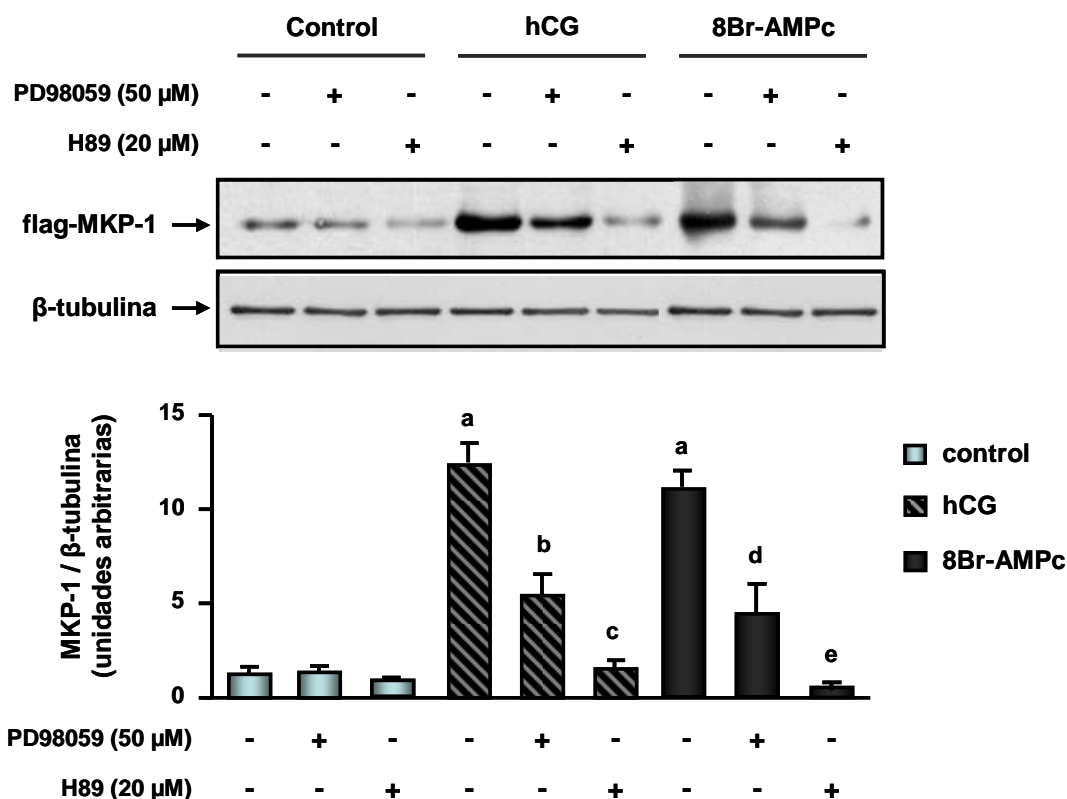


Figura 28. Efecto de la inhibición de PKA y ERK1/2 sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas, luego incubadas en presencia o ausencia de H89 (20 μ M) o PD98059 (50 μ M) y finalmente incubadas con hCG (20 ng/ml) u 8Br-AMPc (0.5 mM) durante 90 minutos. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína β -tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, $P < 0,01$ vs. células controles; b y d, $P < 0,05$; c y e, $P < 0,01$ vs. células estimuladas con hCG u 8Br-AMPc respectivamente, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

También evaluamos el efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre los niveles de la proteína MKP-1 presente en núcleo y mitocondrias. Al igual que lo observado en los lisados celulares, en la fracción nuclear, el PD98059 disminuye parcialmente el incremento de los niveles de la proteína flag-MKP-1 disparados por AMPc (Figura 29). Este efecto parece ocurrir también en las mitocondrias, sin embargo en este compartimento la disminución de los niveles de MKP-1 por PD98059 es menos evidente de lo que se observa en el núcleo.

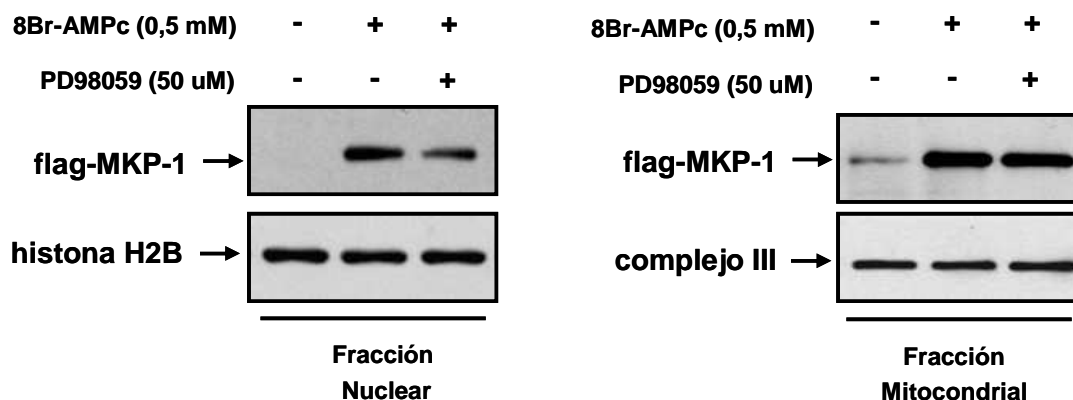


Figura 29. Efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en las fracciones nuclear y mitocondrial de células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas, luego preincubadas en presencia o ausencia PD98059 (50 μ M) y estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 90 minutos. Se realizó un fraccionamiento subcelular y las proteínas se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag o anti-histona H2B o anti-complejo III, como controles de carga. La figura muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos dos veces con similares resultados.

Utilizamos otra estrategia para determinar la acción de ERK1/2 sobre la estabilización de la proteína MKP-1. Realizamos experimentos de sobre-expresión de ERK2 y flag-MKP-1. Para esto, células MA-10 fueron co-transfectadas con los vectores de expresión pFLAG-CMV vacío o conteniendo el ADNc de ERK2, en conjunto con el vector pFLAG-MKP-1. Luego de 24 horas de transfección, las células fueron deprivadas de suero por 24 horas y estimuladas durante 90 minutos con 8Br-AMPc. El análisis por Western blot mostró un incremento en los niveles de la proteína flag-MKP-1 en las células que sobre-expresan flag-ERK2 respecto de las células transfectadas con el plásmido vacío, tanto en condiciones basales como en células estimuladas con 8Br-AMPc (Figura 30). Confirmamos además que la estabilización de flag-MKP-1 por ERK2 es dependiente de la actividad de esta quinasa, dado que en células que sobre-expresan ERK2 y estimuladas con 8Br-AMPc, la preincubación con PD98059 disminuye los niveles de MKP-1 respecto de las células no tratadas con este inhibidor (Figura 30).

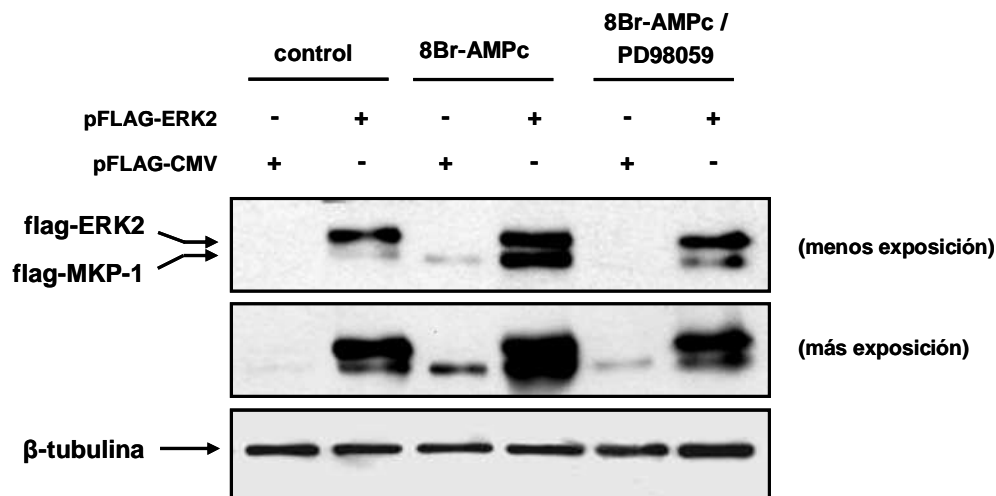


Figura 30. Efecto de la sobre-expresión de ERK2 sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1 y pFLAG-CMV vacío o conteniendo el ADNc de ERK2. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego incubadas en presencia o ausencia de PD98059 (50 μ M) y estimuladas con 8Br-AMPc (0.5 mM) durante 90 minutos. Se obtuvieron los lisados celulares y las proteínas se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag o anti- β -tubulina, como control de carga. La figura muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos tres veces con similares resultados. Se muestran dos tiempos de exposición distintos para evaluar correctamente la señal de flag-MKP-1.

I.4. e. Fosforilación de MKP-1 por acción hormonal en células de Leydig

El cambio en la estabilidad de MKP-1 ante el estímulo hormonal y el papel de PKA y ERK1/2 en este efecto sugieren una modificación post-traducciona de MKP-1 dependiente de la fosforilación por estas quinasas. Por lo tanto a continuación nos planteamos analizar si MKP-1 es sustrato de las quinasas PKA y ERK1/2. Con este fin se planearon experimentos de incorporación de $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4^{3-}$ en células de Leydig MA-10 transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Luego de 24 horas de expresión las células fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego se preincubaron durante 4 horas en un medio de cultivo con fosfato radiactivo (200 μ Ci/ml de $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4^{3-}$) como se detalla en Materiales y Métodos. Luego las células fueron incubadas durante 1 hora con o sin 8Br-AMPc (0,5 mM) o hCG (20 ng/ml). Por último las células se lisaron y se realizó la inmunoprecipitación de la proteína flag-MKP-1 utilizando un anticuerpo anti-flag. El inmunoprecipitado se analizó mediante SDS-PAGE y autorradiografía con el fin de evaluar el estado de fosforilación de la proteína.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto el 8Br-AMPc como la hormona hCG promueven la fosforilación de la proteína MKP-1 (Figura 31).

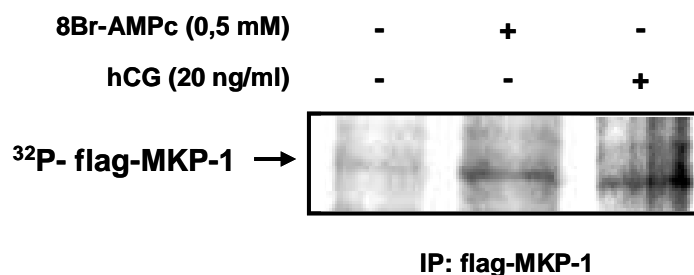


Figura 31. Fosforilación de la proteína flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1 y al día siguiente privadas de suero durante 24 horas. A continuación fueron incubadas con [³²P] fosfato durante 4 horas y luego incubadas durante 1 hora con 8Br-AMPc (0,5 mM) o hCG (20 ng/ml). Luego se inmunoprecipitó la proteína flag-MKP-1 utilizando un anticuerpo específico anti-flag. Los inmunoprecipitados fueron analizados por SDS-PAGE y autorradiografía. Se muestra una autorradiografía representativa donde se observa la señal correspondiente a la proteína ³²P-flag-MKP-1.

Además se analizó el efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre el estado de fosforilación de MKP-1 tanto en las células controles como en las estimuladas con 8Br-AMPc. El análisis por SDS-PAGE y autorradiografía de los inmunoprecipitados de flag-MKP-1 no reveló señal radiactiva en la muestra correspondiente a células preincubadas con PD98059 (Figura 32), lo cual es un sólido argumento para postular que la fosforilación de MKP-1 por hCG/AMPc está mediada por ERK1/2.

En conjunto estos resultados demuestran que la acción hormonal promueve la fosforilación de MKP-1 en células de Leydig de la línea MA-10 a través de un mecanismo dependiente de la actividad de ERK1/2. Nuestros estudios, que demuestran que el bloqueo de la activación de ERK1/2 reduce totalmente la fosforilación de MKP-1 pero reduce sólo parcialmente la acumulación de MKP-1, sugieren que la hormona podría promover la acumulación de la proteína a través de un mecanismo adicional a la fosforilación. Por ejemplo podría promover otra modificación post-traducciona sobre MKP-1 como se ha descrito en otros sistemas [115]. En este contexto sería interesante analizar otras

modificaciones post-traduccionales que impacten sobre la estabilidad de la proteína MKP-1.

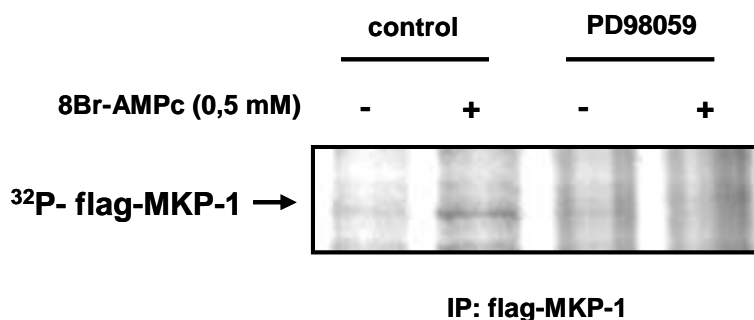


Figura 32. Efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre la fosforilación de flag-MKP-1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1 y al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas. A continuación fueron incubadas con [³²P] fosfato durante 4 horas, luego incubadas en ausencia o presencia de PD98059 (50 μM) y estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 1 hora. Luego de obtener los lisados celulares se inmunoprecipitó la proteína flag-MKP-1 utilizando un anticuerpo específico anti-flag. Los inmunoprecipitados fueron analizados por SDS-PAGE y autorradiografía. Se muestra una autorradiografía representativa donde se observa la señal correspondiente a la proteína ³²P-flag-MKP-1.

I.4. f. Efecto de ACTH sobre los niveles de flag-MKP-1 en células adrenocorticales Y1

Hemos mencionado que el mecanismo de acción de ACTH y LH comprende eventos comunes. Uno de estos eventos es la inducción hormonal de MKP-1, ya que hemos demostrado en trabajos previos que ACTH induce esta proteína por una acción a nivel transcripcional [107], al igual que LH/AMPc según se demuestra en el presente trabajo. Nos preguntamos si en células adrenocorticales la hormona ACTH también ejerce una regulación a nivel post-traduccionales de MKP-1. Para responder esta pregunta evaluamos los niveles de flag-MKP-1 en células adrenocorticales de la línea Y1 transfectadas transitoriamente con el vector de expresión pFLAG-MKP-1, estimuladas durante distintos

tiempos con ACTH (20 mU/ml). Demostramos que en estas células el estímulo con la hormona también incrementa los niveles de la proteína flag-MKP-1 (Figura 33).

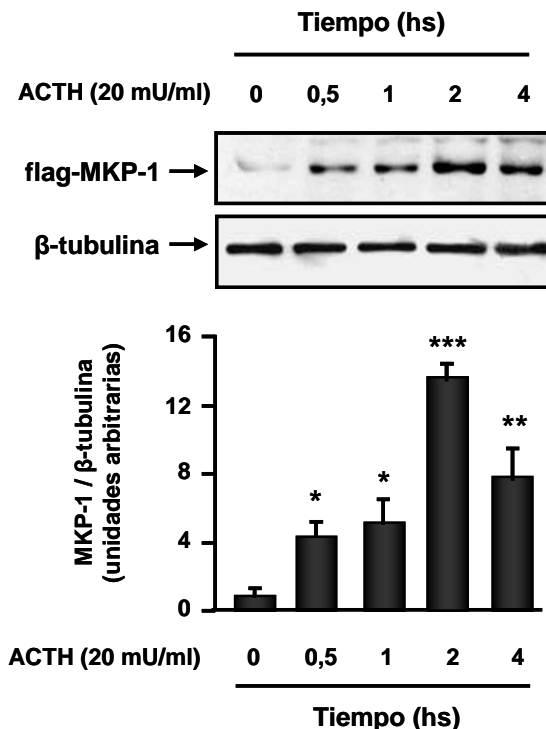


Figura 33. Efecto de ACTH sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células adrenocorticales Y1. Las células Y1 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego incubadas con ACTH (20 mU/ml) durante los tiempos indicados. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína β-tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ y ***, $P < 0,001$ vs. células controles, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Luego de comprobar que ACTH regula a nivel post-traduccional los niveles de MKP-1, analizamos la participación de PKA y ERK en este efecto. Mediante Western blot con el anticuerpo anti-flag observamos que en células transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1 la preincubación con H89 o PD98059 reduce el incremento en los niveles de la misma promovido por 8Br-AMPC o ACTH, lo cual pone en evidencia la participación de PKA y ERK1/2 en la estabilización de MKP-1 por estímulo hormonal (Figura 34).

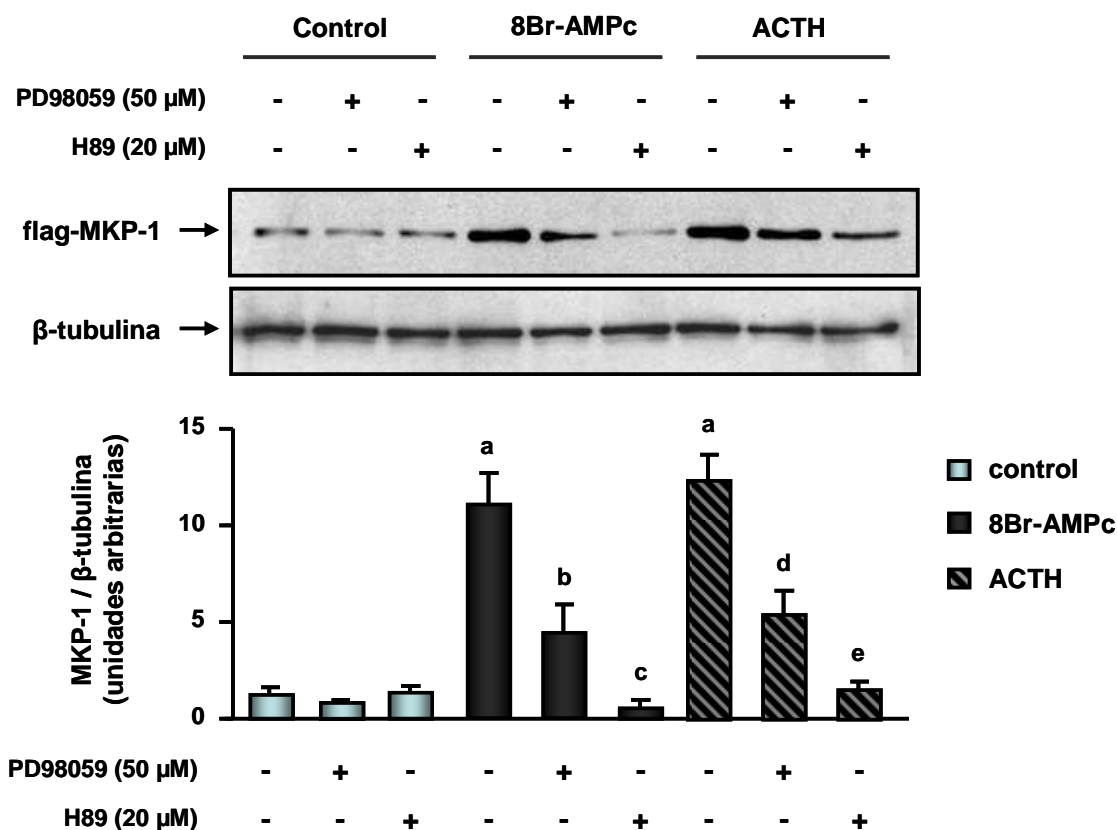


Figura 34. Efecto de la inhibición de PKA y ERK1/2 sobre los niveles de la proteína flag-MKP-1 en células adrenocorticales Y1. Las células Y1 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-1. Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas, luego incubadas en presencia o ausencia de H89 (20 μ M) o PD98059 (50 μ M) y estimuladas con ACTH (20 mU/ml) u 8Br-AMPC (0.5 mM) durante 90 minutos. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-MKP-1 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína β -tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, $P < 0,01$ vs. células controles; b y d, $P < 0,05$; c y e, $P < 0,01$ vs. células estimuladas con 8Br-AMPC y ACTH respectivamente, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

En conjunto, estos resultados indican, en primer lugar, que en ambas líneas celulares el estímulo hormonal promueve la estabilización de la proteína MKP-1 y en segundo lugar, que el mecanismo de estabilización involucra la actividad de las quinasas PKA y ERK1/2, sugiriendo que MKP-1 podría ser sustrato directo de ambas enzimas. Postulamos entonces que una modificación post-traducciona sobre la proteína MKP-1, como ser la fosforilación, impediría su degradación por el proteasoma. Los experimentos de incorporación de fosfato

radiactivo (^{32}P) aquí presentados demuestran que, al menos en células de Leydig, MKP-1 es sustrato de ERK1/2.

A continuación describiremos los experimentos relacionados con el tercer y cuarto objetivo de este Trabajo de Tesis destinados a estudiar el rol funcional de MKP-1 en la regulación de la esteroidogénesis.

II. ROL FUNCIONAL DE MKP-1 EN LA REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS

II.1. ESTRATEGIA PARA EL ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE MKP-1 EN LA REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS

Hemos mencionado en la introducción que las MAP quinasas regulan tanto la actividad como la expresión de un amplio grupo de factores de transcripción y que en células esteroideogénicas la actividad de ERK1/2 es necesaria para la regulación de la proteína StAR. Dos factores de transcripción claves en la regulación de la expresión de StAR y que dependen de la actividad de MAP quinasas son NUR77 y SF-1 [210, 212, 213]. Estos factores también participan en la transcripción de varios genes que codifican para enzimas que intervienen en la biosíntesis de esteroides.

Nuestra hipótesis propone que la capacidad de los factores SF-1 y/o NUR77 de promover el reclutamiento de cofactores y/o su actividad de unión al promotor de StAR y de otros genes relacionados con la esteroideogénesis, podría ser modulada por MKP-1 a través de su acción sobre las MAPKs. La inducción de MKP-1 constituiría entonces un mecanismo de cierre de la estimulación hormonal. Más interesante aún, MKP-1 podría delimitar el cierre de la etapa aguda de estimulación y el inicio de la etapa crónica de la esteroideogénesis.

Para evaluar el rol funcional de MKP-1 en la regulación de la esteroideogénesis, se analizó la producción de esteroides en células con distinto nivel de expresión de MKP-1. Para aumentar o disminuir los niveles de esta proteína, en forma independiente del estímulo hormonal, la estrategia utilizada consistió en transfectar transitoriamente las células con vectores que permiten la sobre-expresión o la disminución de la expresión de la MKP-1.

II.1. a. Diseño y validación de construcciones utilizadas para modificar el grado de expresión de la proteína MKP-1

Para realizar las construcciones mencionadas, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por RT-PCR el ADNc de MKP-1 a partir del ARN total obtenido de células de Leydig de la línea MA-10 cultivadas en presencia de suero (ver Materiales y

Métodos). Luego de la reacción de PCR se obtuvo una banda específica de 1,7 Kb que fue purificada y clonada en el sitio *EcoRI* del vector pRc/CMVi. De esta forma se obtuvieron dos construcciones, pRc/CMVi-MKP-1(s), donde el ADNc de MKP-1 se clonó en orientación sentido y pRc/CMVi-MKP-1(as), donde el ADNc de este gen se clonó en orientación antisentido (Figura 35).

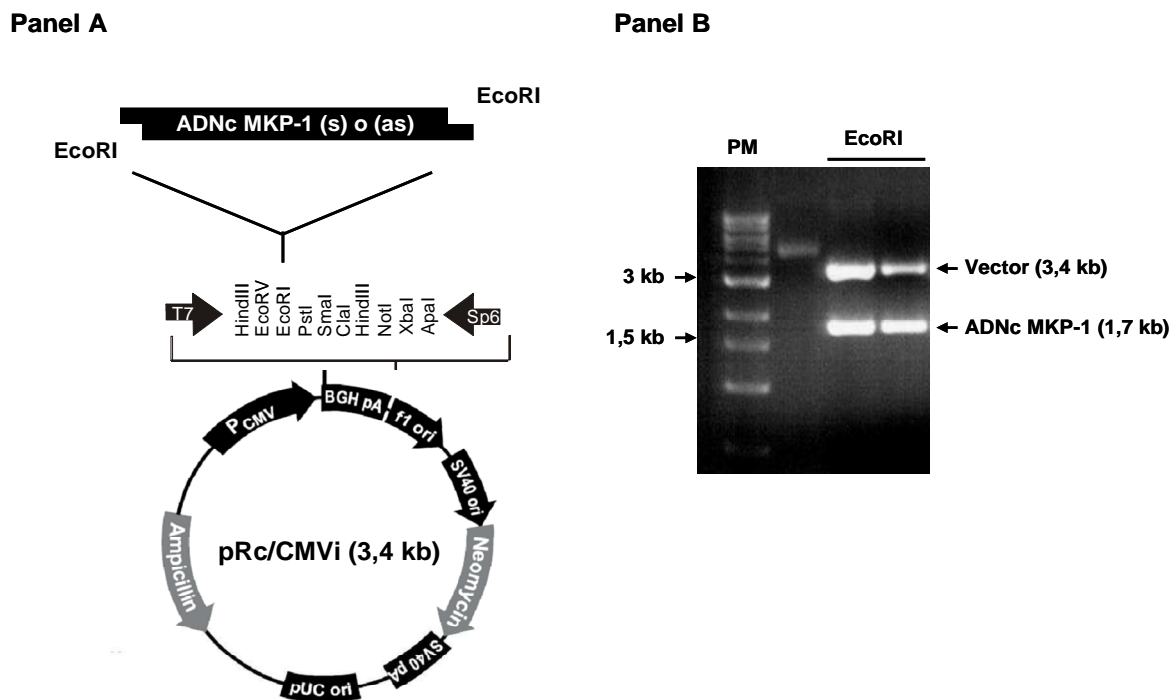


Figura 35. Esquema de los vectores utilizados para aumentar o disminuir la expresión de la proteína MKP-1 en células de Leydig MA-10. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar mediante RT-PCR el ADNc del gen MKP-1 de ratón. El producto de la reacción de PCR (1,7 kb) fue clonado en el sitio *EcoRI* del vector de expresión pRc/CMVi (3,4 Kb) para obtener las construcciones sentido y antisentido del gen de MKP-1 (**Panel A**). Se corroboró la presencia del inserto de 1,7 kb en el vector mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis en geles de agarosa con bromuro de etidio (**Panel B**). PM: marcadores de peso molecular.

Luego de obtener las construcciones descritas, se procedió a analizar la funcionalidad de las mismas evaluando su capacidad de modificar el nivel de expresión de la proteína MKP-1. Para esto, células de Leydig MA-10 fueron transfectadas transitoriamente con las construcciones pRc/CMVi-MKP-1(s) o pRc/CMVi-MKP-1(as) para analizar, a continuación, los niveles de MKP-1 mediante Western blot.

Las células que fueron transfectadas con la construcción pRc/CMVi-MKP-1(s) mostraron un incremento significativo de los niveles de la proteína MKP-1 a las 2 horas de estimulación con AMPc, respecto de las células transfectadas con el plásmido vacío (Figura 36, Panel A). Por otro lado, se detectó una disminución importante en los niveles de la proteína en aquellas células que sobre-expresaban la construcción antisentido de MKP-1, evaluado luego de 2 horas de estimulación (Figura 36, Panel B).

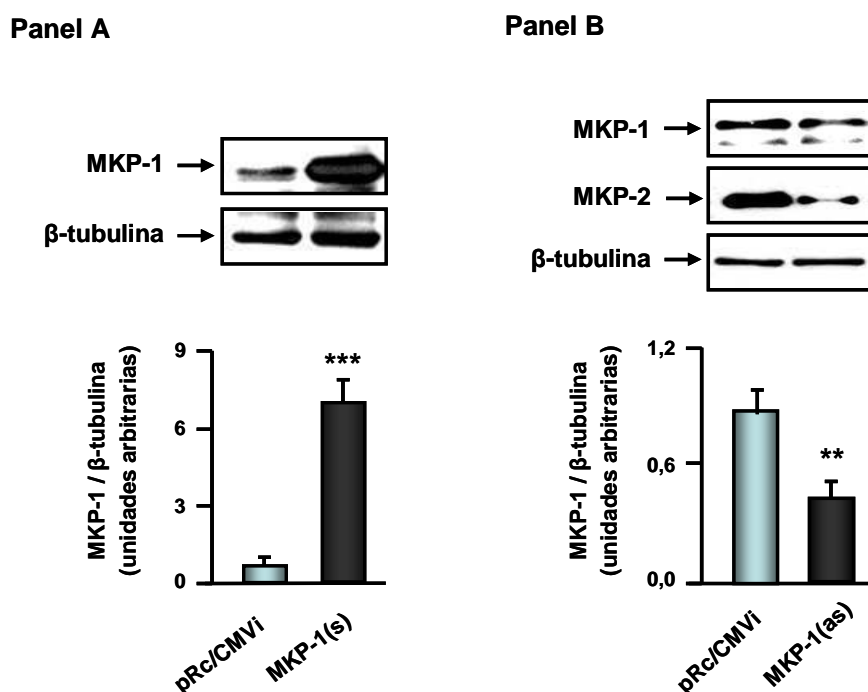


Figura 36. Efecto de la transfección de las células MA-10 con los vectores pRc/CMVi-MKP-1 sentido o antisentido sobre el nivel de expresión de la proteína MKP-1. Las células MA-10 fueron transfectadas con los vectores pRc/CMVi vacío o pRc/CMV-MKP-1 sentido (MKP-1(s)) (**Panel A**) o antisentido (MKP-1(as)) (**Panel B**). Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 2 o 3 horas, respectivamente. Se evaluó el nivel de expresión de las proteínas MKP-1 y MKP-2 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-MKP-1. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína β -tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. **, $P < 0,01$ y ***, $P < 0,001$ vs. células transfectadas con el pRc/CMVi vacío, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Durante el transcurso de nuestras investigaciones demostramos que hCG/AMPc también incrementa la expresión de MKP-2, una proteína fosfatasa de secuencia similar a

MKP-1 y con una cinética de expresión mas tardía que ésta. Más aún, el anticuerpo comercial anti-MKP-1 utilizado en este trabajo reconoce también a esta isoforma (Figura 36). Dado que la estrategia de la sobre-expresión del ADNc antisentido repercutió también sobre esta isoforma (Figura 36, Panel B), nos pareció apropiado implementar otro abordaje que fuera específico para disminuir la expresión de MKP-1, como se discutirá en el siguiente punto.

II.1. b. Diseño y validación de la construcción utilizada para disminuir el grado de expresión de la proteína MKP-1 mediante siRNA

Una estrategia alternativa consistió en la expresión de un ARN pequeño de interferencia (siRNA). Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos cuya secuencia es idéntica a una región específica del ARNm de MKP-1 y que tiene la propiedad de formar una estructura secundaria o bucle (ver Materiales y Métodos). Los oligonucleótidos fueron clonados en el vector pSUPER.retro para obtener la construcción pSUPER.retro-MKP-1 (Figura 37). La transfección de las células con esta construcción lleva a la degradación específica del ARNm de MKP-1.

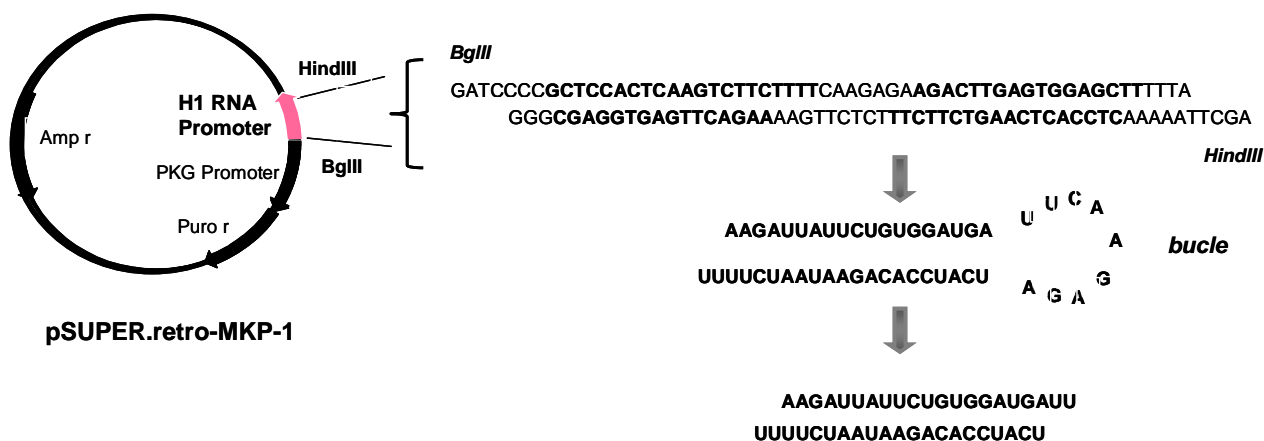


Figura 37. Esquema del vector utilizado para disminuir la expresión de la proteína MKP-1 en células de Leydig MA-10 mediante la estrategia de siRNA. Se diseñaron oligonucleótidos de 19 pb de secuencia idéntica a una región del ARNm de MKP-1 con la capacidad de formar estructura secundaria. Los oligonucleótidos fueron clonados en el vector pSUPER.retro bajo el control del promotor de la ARN polimerasa III, en los sitios *HindIII* y *BgIII*.

Cuando se analizaron los niveles de MKP-1 en las células transfectadas con el plásmido que expresa el siRNA específico de MKP-1 se evidenció una importante disminución en los niveles de la proteína endógena. Según se observa, la transfección con el siRNA parece ser más específica para disminuir la expresión de MKP-1 que la transfección con el ADNc antisentido (Figura 36, Panel B y Figura 38). También corroboramos que la expresión del siRNA no afectó mayormente el nivel de la isoforma MKP-2.

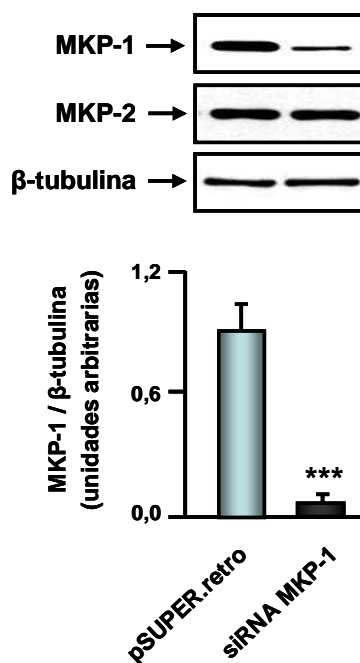


Figura 38. Efecto de la transfección de las células MA-10 con el pSUPER.retro-siRNA-MKP-1 sobre el nivel de expresión de la proteína MKP-1. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pSUPER.retro vacío o el pSUPER.retro-MKP-1 (siRNA-MKP-1). Al día siguiente fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 3 horas. Se evaluó el nivel de expresión de las proteínas MKP-1 y MKP-2 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-MKP-1. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-1, normalizados contra la señal de la proteína β-tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. ***, $P < 0,001$ vs. células transfectadas con el pSUPER.retro vacío, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

II.1. c. Determinación de la actividad de tirosina fosfatasas en células que sobre-expresan MKP-1

Para evaluar la funcionalidad de la construcción que sobre-expresa MKP-1 determinamos la actividad de tirosina fosfatasas en las células transfectadas con el vector pRc/CMVi-MKP-1(s). El ensayo utilizado consiste en evaluar la radioactividad que emite el ^{32}P i liberado por la hidrólisis de un sustrato marcado radiactivamente, el $[\text{}^{32}\text{P}]$ -poli-Glutámico-Tirosina (pG $[\text{}^{32}\text{P}]$ T). Para este ensayo se incuban lisados de células que fueron transfectadas con el vector pRc/CMVi-MKP-1(s) o de células transfectadas con el plásmido vacío como control (pRc/CMVi) con el pG $[\text{}^{32}\text{P}]$ T, que actúa como sustrato de MKP-1 en reacciones *in vitro* (Figura 39).

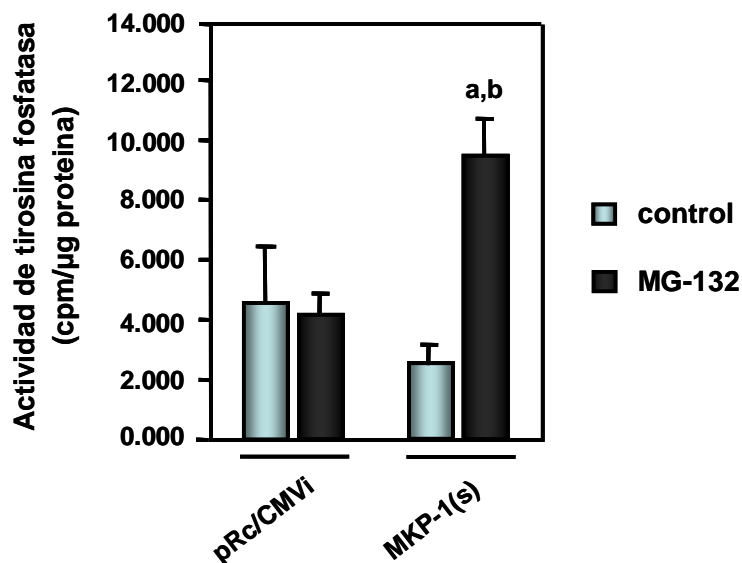


Figura 39. Efecto de la sobre-expresión de MKP-1 sobre la actividad de tirosina fosfatasas en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pRc/CMVi vacío o el pRc/CMV-MKP-1 sentido (MKP-1(s)). Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego incubadas con MG-132 (20 μM) durante 2 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se determinó la actividad de tirosina fosfatasas. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de dos experimentos independientes. a, $P < 0,05$ versus células transfectadas con pRc/CMVi vacío e incubadas en presencia de MG-132, b, $P < 0,01$ versus células transfectadas con MKP-1(s) incubadas en ausencia de MG-132, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

No se observó un aumento significativo en la actividad de tirosina fosfatasa en los lisados de células que sobre-expresan MKP-1 respecto de las células controles. Este resultado no es contradictorio ya que MKP-1 es una proteína de alto recambio, cuyos niveles están estrictamente regulados por acción del proteasoma. Como describimos en este trabajo, en células de Leydig MA-10, la vía principal de degradación de MKP-1 es a través del proteasoma y hemos visto que en células controles, no estimuladas, MKP-1 es degradada rápidamente. Esto explicaría por qué no hay diferencias en la actividad de tirosina fosfatasa en las células que sobre-expresan MKP-1 respecto de las transfectadas con el plásmido vacío. Sin embargo, cuando las células fueron preincubadas con un inhibidor del proteasoma (MG-132), para favorecer la acumulación de la proteína, los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en el grado de actividad de tirosina fosfatasa en las células que sobre-expresan MKP-1 (pRc/CMVi + MG = 4049 ± 409 vs. pRc/CMVi-MKP-1 + MG = 9824 ± 865 cpm/min/ μ g proteína, $P < 0,05$) (Figura 39).

II.1. d. Efecto de la sobre-expresión o inhibición de la expresión de MKP-1 sobre el grado de fosforilación de ERK1/2

Dado que en nuestra hipótesis proponemos que MKP-1 participaría en la regulación de la esteroidogénesis a través de su acción sobre la actividad de ERK1/2, el siguiente paso fue evaluar el grado de activación de esta MAP quinasa en las células transfectadas con los vectores pRc/CMVi-MKP-1(s) o pRc/CMVi-MKP-1(as) o con el siRNA de MKP-1, y estimuladas con 8Br-AMPC durante distintos tiempos.

En primera medida fue necesario determinar la cinética de activación de ERK1/2 en células de Leydig MA-10 frente a la estimulación con 8Br-AMPC. Para esto evaluamos en la fracción nuclear, la activación de ERK1/2 y demostramos que los niveles de fosfo-ERK1/2 aumentan rápidamente luego de la estimulación con AMPC, exhibiendo un valor máximo a los 7 minutos (Figura 40). Luego de este tiempo los niveles de fosfo-ERK disminuyen hasta alcanzar los valores basales.

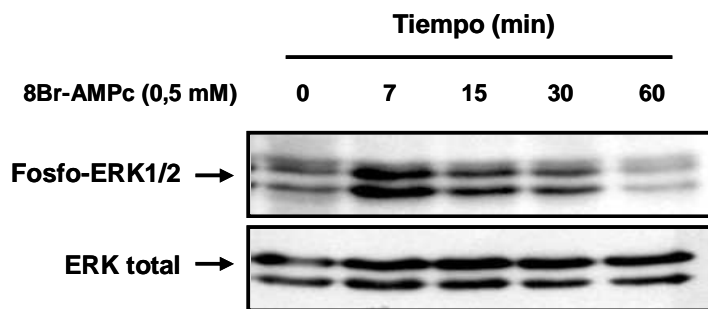


Figura 40. Efecto del AMPc sobre la activación de ERK1/2 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante los tiempos indicados. Se realizó un fraccionamiento subcelular y se evaluó el nivel de fosfo-ERK1/2 en la fracción nuclear mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-fosfo-ERK1/2 o anti-ERK total como control de carga. La figura muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos tres veces con similares resultados.

A continuación evaluamos el efecto de la sobre-expresión de MKP-1 sobre el grado de activación de ERK1/2 mediante Western blot a tiempos cortos de estimulación. Observamos que en todos los tiempos de estimulación con 8Br-AMPC (7 y 15 minutos) el nivel de fosforilación de ERK1/2 es menor en las células que sobre-expresan la proteína MKP-1 respecto de las células controles transfectadas con el plásmido vacío (Figura 41, panel A). Por el contrario, en las células que sobre-expresan el siRNA de MKP-1 el tratamiento con AMPc fue capaz de incrementar los niveles de fosfo-ERK1/2 y prolongar su marco temporal de acción (Figura 41, panel B). Similares resultados se obtuvieron en las células que sobre-expresan la secuencia antisentido de MKP-1 (datos no mostrados).

Este resultado demuestra que la proteína MKP-1 sobre-expresada es funcional ya que reduce la actividad de ERK1/2 promovida por AMPc. También confirmamos la funcionalidad del siRNA de MKP-1 en cuanto a su capacidad de inhibir la expresión de la proteína MKP-1 endógena y de esta forma repercutir en un mayor nivel de activación de ERK1/2 frente a la estimulación con AMPc y además prolongar el marco temporal de acción de esta quinasa.

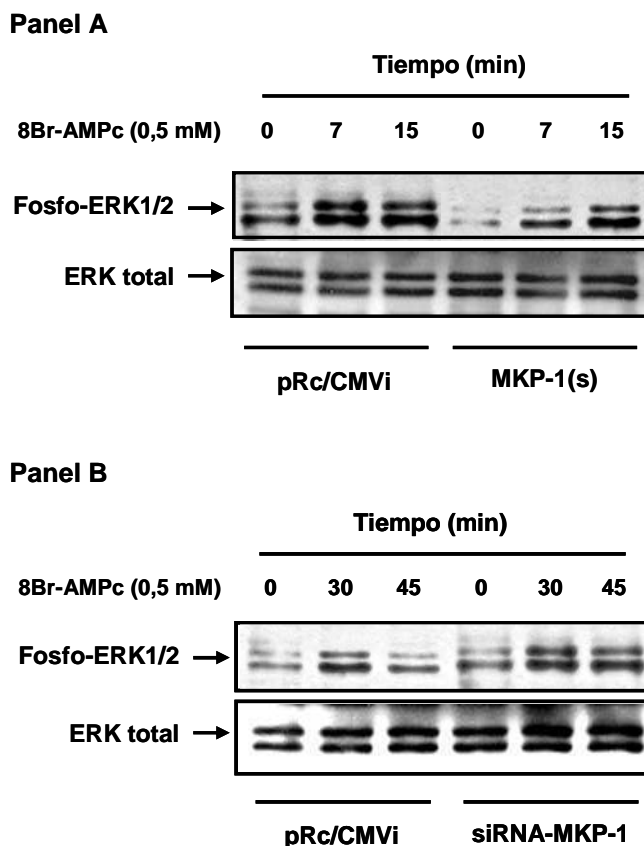


Figura 41. Efecto de la sobre-expresión o inhibición de MKP-1 sobre los niveles de fosfo-ERK1/2 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pRc/CMVi vacío o el pRc/CMVi-MKP-1 sentido (MKP-1(s)) (**Panel A**) o el pSUPER.retrp-MKP-1 (siRNA-MKP-1) (**Panel B**). Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante los tiempos indicados. Se evaluó el nivel de activación de ERK1/2 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-fosfo-ERK1/2. La figura muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos tres veces con similares resultados.

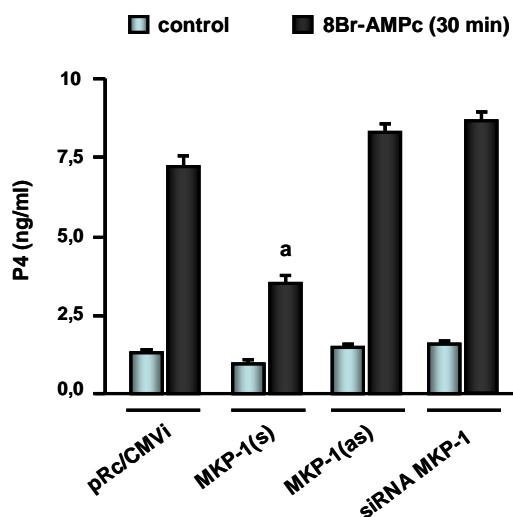
II.2. EFECTO DE MKP-1 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10

Dado que la sobre-expresión de MKP-1 disminuye los efectos de la hormona sobre el grado de fosforilación de ERK1/2, y que la actividad de esta quinasa es necesaria en la cascada de señalización involucrada en la activación hormonal de la esteroidogénesis, el

siguiente objetivo fue evaluar los efectos de la sobre-expresión o inhibición de la expresión de MKP-1 sobre la producción de esteroides estimulada por 8Br-AMPC. Para esto se transfectaron células de Leydig MA-10 con los vectores pRc/CMVi-MKP-1(s) o pRc/CMVi-MKP-1(as) o con el pSUPER.retro-MKP-1. Las células fueron deprivadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante distintos tiempos. La producción de esteroides en el medio de cultivo fue evaluada mediante RIA.

Se observó una disminución significativa en la producción de progesterona (P4, expresada en pg/ml) en las células que sobre-expresan MKP-1 tanto a los 30 minutos (pRc/CMVi = $7,37 \pm 0,04$ vs. MKP-1(s) = $3,52 \pm 0,04$; $P < 0,01$) (Figura 42, Panel A), como a las 2 horas de estimulación con 8Br-AMPC (pRc/CMVi = $98,4 \pm 3,9$ vs. MKP-1(s) = $53,1 \pm 8,5$; $P < 0,01$) (Figura 42, Panel B).

Panel A



Panel B

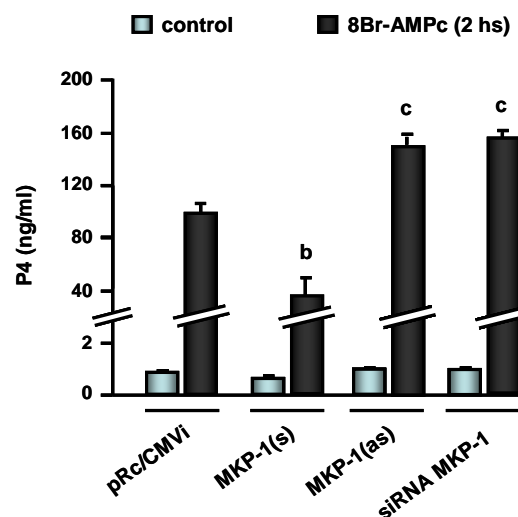


Figura 42. Efecto de la sobre-expresión o inhibición de la expresión de MKP-1 sobre la producción de esteroides en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pRc/CMVi vacío o el pRc/CMVi-MKP-1 sentido (MKP-1(s)), o antisentido (MKP-1(as)), o el pSUPER.retro-MKP-1 (siRNA MKP-1). Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante 30 minutos (**Panel A**) o 2 horas (**Panel B**). La concentración de progesterona (P4) en el medio de cultivo fue evaluada por RIA. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, b y c, $P < 0,01$ y vs. células transfectadas con pRc/CMVi vacío y estimuladas con 8Br-AMPC, analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

Por otra parte, el bloqueo de la expresión de MKP-1 mediante la transfección del ADNc antisentido de MKP-1 o el siRNA fue eficaz para aumentar la producción de P4 estimulada por AMPc sólo a las 2 horas de estimulación y no a tiempos menores (pRc/CMVi = $98,4 \pm 3,9$ vs. MKP-1(as) = $150,9 \pm 9,9$; vs. siRNA-MKP-1 = $152,1 \pm 10,1$; $P < 0,01$) (Figura 42, Panel B).

Estos resultados demuestran un rol de MKP-1 en la regulación de la esteroidogénesis por su acción sobre la actividad de ERK1/2. A continuación se analizó a nivel molecular cual es el mecanismo por el cual MKP-1 regula la producción de esteroides en células de Leydig MA-10, centrandose especial atención en la regulación transcripcional de StAR y otros genes esteroidogénicos.

II.3. EFECTO DE MKP-1 SOBRE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES RELACIONADOS CON LA ESTEROIDOGÉNESIS

II.3. a. Efecto de MKP-1 sobre la expresión de StAR

El hecho de que existen factores de transcripción relacionados con la regulación de la esteroidogénesis, cuya expresión y/o actividad es dependiente de ERK1/2, nos lleva a postular que la expresión de MKP-1 conduciría a un cese de la actividad transcripcional dependiente de esta quinasa. Basados en estos conceptos y en los resultados obtenidos al evaluar la producción de esteroides en células con diferente grado de expresión de MKP-1, decidimos estudiar posibles efectos nucleares de esta fosfatasa.

Primeramente analizamos el efecto de la inhibición de ERK sobre la actividad del promotor de StAR en células que fueron transfectadas con una construcción que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de StAR (pGL3-StAR), como se detalla en Materiales y Métodos. Conforme a lo que está descrito, se determinó que el 8Br-AMPc incrementa la actividad del promotor de StAR (Figura 43). También demostramos que la inhibición de la actividad de ERK1/2, por el agregado de PD98059, disminuye el efecto del AMPc sobre la actividad de este promotor. Este efecto es dependiente del tiempo de incubación con este compuesto ya que produce una inhibición

máxima cuando se agrega conjuntamente con el estímulo y pierde su eficacia cuando se agrega pasadas 2 horas del inicio de la estimulación (Figura 43).

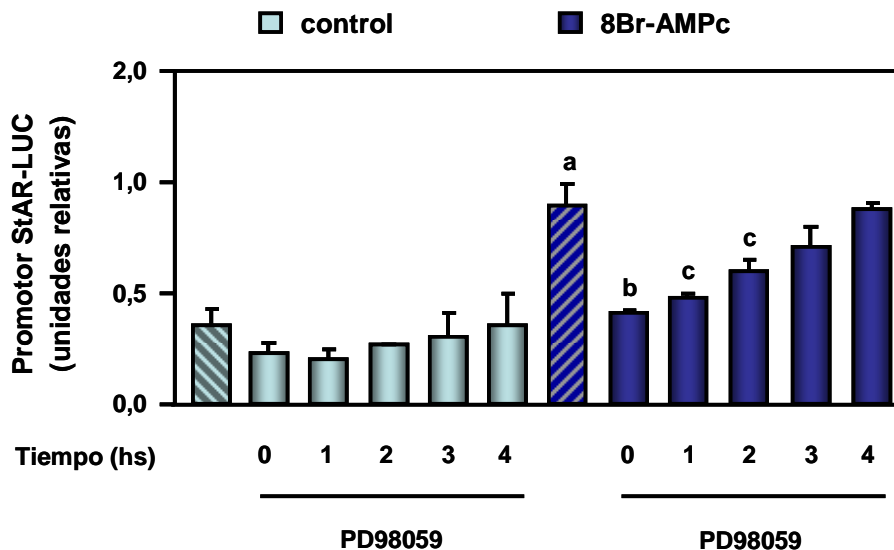


Figura 43. Efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre la actividad del promotor de StAR en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector pGL3-StAR y el plásmido pRL. Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante 6 horas, en ausencia (barras rayadas) o en presencia de PD98059 (50 μ M) agregado a los tiempos indicados respecto del inicio de la estimulación. Se obtuvieron los lisados celulares y se midió la actividad de luciferasa. Cada valor fue normalizado respecto la actividad de luciferasa de *Renilla*. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas incubadas en ausencia de PD98059; b, $P < 0,001$; c, $P < 0,01$ vs. células estimuladas con 8Br-AMPC en ausencia de PD98059, analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

A continuación se analizó el efecto de la sobre-expresión de MKP-1 sobre la actividad del promotor de StAR. Con este fin las células MA-10 fueron co-transfectadas con el plásmido conteniendo el ADNc de MKP-1 en orientación sentido o antisentido (pRc/CMVi-MKP-1(s) o pRc/CMVi-MKP-1(as)) o el pSUPER.retro-MKP-1 junto con el vector pGL3-StAR y luego estimuladas con 8Br-AMPC durante 6 horas. Luego se determinó la actividad de luciferasa en los lisados celulares.

Nuestros experimentos demostraron que en células estimuladas la sobre-expresión de MKP-1 produce una disminución significativa de la actividad de luciferasa respecto de las

células transfectadas con el plásmido vacío (pRc/CMVi = $1,23 \pm 0,08$ vs. MKP-1(s) = $0,83 \pm 0,06$, en unidades relativas; $P < 0,01$) (Figura 44).

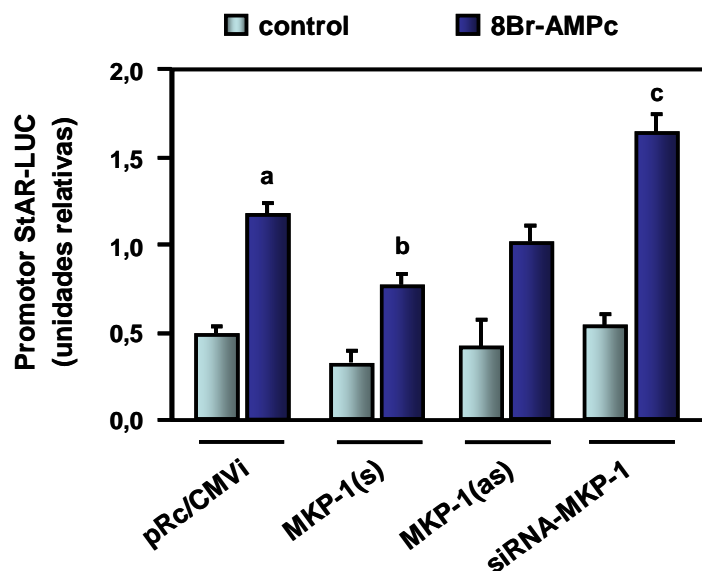


Figura 44. Efecto de la sobre-expresión o inhibición de MKP-1 sobre la actividad del promotor de StAR en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector pGL3-StAR y el plásmido control pRL junto al vector pRc/CMVi vacío o el pRc/CMVi-MKP-1 sentido (MKP-1(s)), o antisentido (MKP-1(as)), o con el pSUPER.retro-MKP-1 (siRNA-MKP-1). Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 6 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se midió la actividad de luciferasa. Cada valor fue normalizado respecto a la actividad de luciferasa de *Renilla*. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células transfectadas con el pRc/CMVi controles no estimuladas; b y c, $P < 0,01$ vs. células transfectadas con el pRc/CMVi y estimuladas con 8Br-AMPc, analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

A diferencia de lo observado en las células que sobre-expresan MKP-1, en las células transfectadas con la construcción que porta la secuencia antisentido de MKP-1 la actividad del promotor de StAR no mostró diferencias significativas respecto a la registrada en las células controles (Figura 44). Sin embargo el bloqueo de la expresión de MKP-1 por el siRNA aumentó significativamente la actividad de este promotor en células estimuladas con AMPc (pRc/CMVi = $1,23 \pm 0,08$ vs. siRNA MKP-1 = $1,78 \pm 0,11$, en unidades relativas; $P < 0,01$) (Figura 44).

La modificación de la actividad del promotor de StAR observada en las células que expresan niveles variables de MKP-1 podría reflejarse en una alteración en los niveles del

ARNm de StAR. Para analizar esta posibilidad las células MA-10 fueron transfectadas con los vectores pRc/CMVi-MKP-1(s) o el pSUPER.retro-MKP-1 o con el plásmido vacío como control, deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC durante distintos tiempos. Luego se aisló el ARN total y se cuantificó el nivel del ARNm de StAR por PCR en tiempo real.

Al igual que lo observado con la producción de esteroides, se observó una disminución significativa en los niveles del ARNm de StAR en las células que sobre-expresan MKP-1 en todos los tiempos analizados (Figura 45). Por el contrario cuando se analizó el nivel de ese mensajero en las células donde la expresión de MKP-1 está inhibida por acción del siRNA, se vio un aumento significativo del mismo respecto de lo observado en las células controles transfectadas con el plásmido vacío (Figura 45).

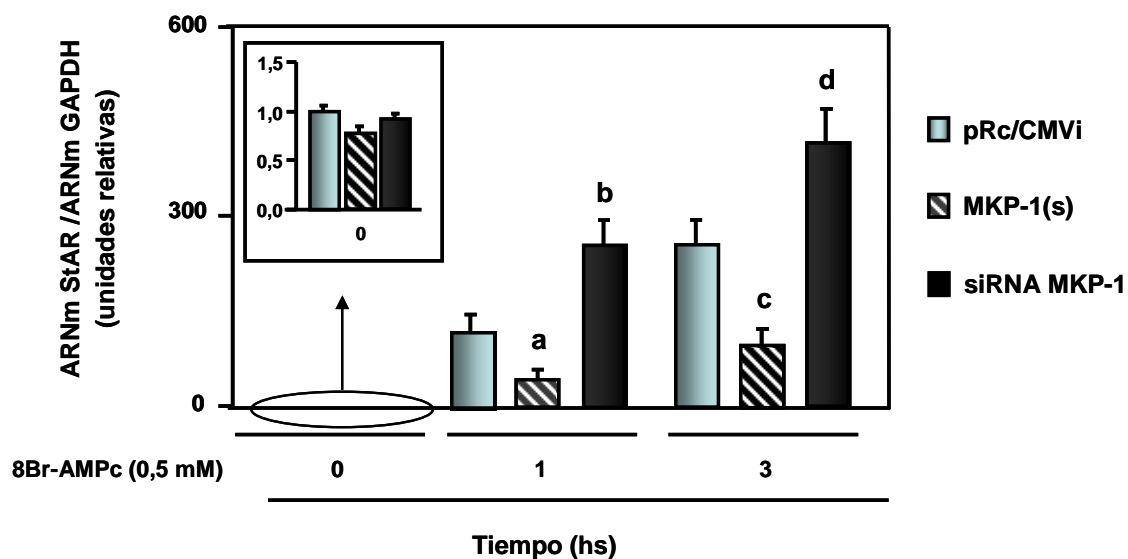


Figura 45. Efecto de la sobre-expresión o inhibición de la expresión de MKP-1 sobre el nivel del ARNm de StAR en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pRc/CMVi vacío o el pRc/CMV-MKP-1 sentido (MKP-1(s)) o el pSUPER.retro-MKP-1 (siRNA-MKP-1). Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante los tiempos indicados. Luego se extrajo el ARN total y se llevaron a cabo reacciones de *RT-PCR* y *Real Time PCR* para el análisis de la expresión del ARNm de StAR. La figura muestra el nivel de expresión del ARNm de StAR, normalizado contra el valor del ARNm de GAPDH. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de dos experimentos independientes. a y c, $P < 0,01$; b y d $P < 0,05$ vs. células transfectadas con el pRc/CMVi y estimuladas con 8Br-AMPC 1 y 3 horas respectivamente, analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

Estos resultados muestran que la variación en el grado de expresión de MKP-1 (sobre-expresión o bloqueo de la expresión) altera los niveles del ARNm de StAR de la misma manera que afecta la actividad del promotor.

En conclusión estos resultados demuestran que la disminución en la síntesis de esteroides en las células que sobre-expresan MKP-1 se debe, al menos en parte, a la inhibición en la expresión de StAR. Por otra parte, al aumento en la síntesis de esteroides cuando se bloquea la expresión de MKP-1 está relacionado con el aumento de la expresión de StAR.

II.3. b. Efecto de MKP-1 sobre la actividad del promotor de NUR77

Dado que se conoce que hCG/AMPc promueve la expresión del factor de transcripción NUR77 y que este evento es necesario para que la hormona incremente los niveles del mensajero de StAR, nos propusimos evaluar el efecto de la variación en la expresión de MKP-1 sobre la actividad del promotor de NUR77.

Si bien se conoce que hCG/AMPc aumenta la actividad del promotor de NUR77, se desconoce si este evento es dependiente de la actividad de ERK1/2 en células de Leydig MA-10. Si lo anterior resultara cierto la variación en los niveles de MKP-1 podría repercutir en la actividad este promotor. Para comprobar esta hipótesis analizamos los efectos de la inhibición de ERK sobre la actividad del promotor de NUR77. Con este propósito las células de Leydig de la línea MA-10 fueron co-transfectadas con el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de NUR77 (pGL3-NUR77), luego estimuladas con 8Br-AMPc durante 4 horas y al término de esto, procesadas para la determinación de la actividad de luciferasa.

En concordancia con lo que describe la bibliografía, comprobamos que la estimulación con el análogo permeable del AMPc incrementa la actividad del promotor de NUR77. Demostramos que la preincubación con PD98059 reduce significativamente este efecto (Figura 46), lo cual sugiere que la actividad de ERK1/2 es necesaria en la expresión de este factor.

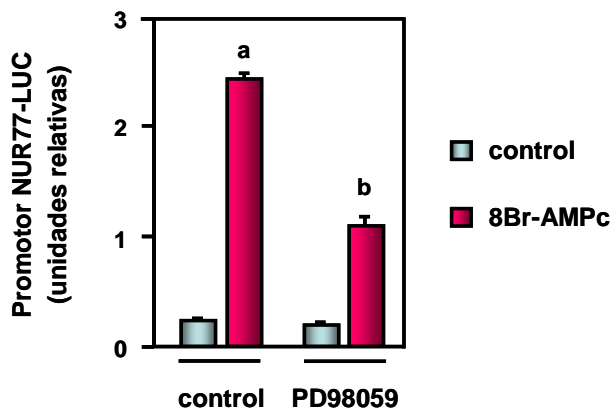


Figura 46. Efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre la actividad del promotor de NUR77 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector pGL3-NUR77 y el plásmido pRL. Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y preincubadas en presencia o ausencia de PD98059 (50 μ M) y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante 4 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se midió la actividad de luciferasa. Cada valor fue normalizado respecto la actividad de luciferasa de *Renilla*. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas incubadas en ausencia de PD98059; b, $P < 0,001$ vs. células estimuladas con 8Br-AMPC en ausencia de PD98059, analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

A continuación evaluamos el efecto de la sobre-expresión del ADNc de MKP-1 sentido y antisentido y del siRNA de MKP-1 sobre la actividad del promotor de NUR77. Con este propósito las células MA-10 fueron co-transfectadas con los vectores pGL3-NUR77 y pRc/CMVi-MKP-1(s) o pRc/CMVi-MKP-1(as) o pSUPER.retro-MKP-1 o el plásmido vacío como control. Luego las células fueron estimuladas con 8Br-AMPC durante 4 horas y al término de esto, procesadas para la determinación de la actividad de luciferasa.

Los resultados mostraron que la sobre-expresión de MKP-1 disminuye el efecto del AMPc sobre la actividad del promotor de NUR77. Como muestra la figura, la actividad de luciferasa estimulada por el análogo del segundo mensajero es menor en las células transfectadas con el plásmido pRc/CMVi-MKP-1(s) que en las células transfectadas con el plasmado vacío (pRc/CMVi = $1,61 \pm 0,19$ vs. MKP-1(s) = $0,79 \pm 0,11$, en unidades relativas, $P < 0,001$) (Figura 47).

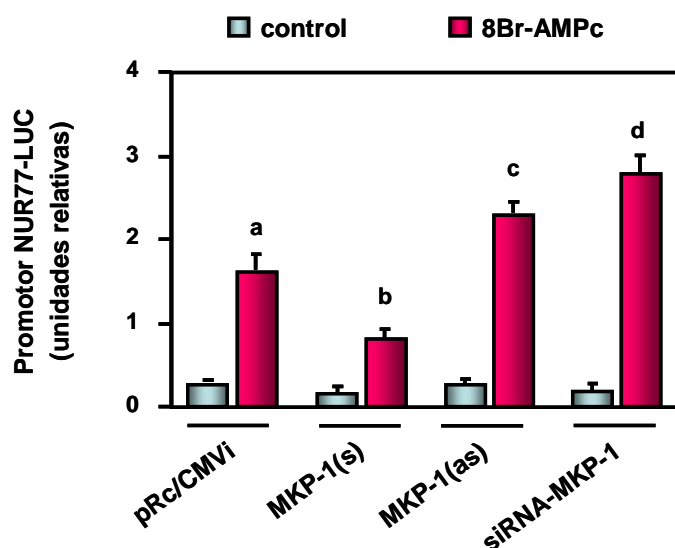


Figura 47. Efecto de la sobre-expresión o inhibición de MKP-1 sobre la actividad del promotor de NUR77 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector pGL3-NUR77 y el plásmido control pRL junto al vector pRc/CMVi vacío o pRc/CMVi-MKP-1 sentido (MKP-1(s)) o antisentido (MKP-1(as)) o con el pSUPER.retro-MKP-1 (siRNA-MKP-1). Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 4 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se midió la actividad de luciferasa. Cada valor fue normalizado respecto a la actividad de luciferasa de *Renilla*. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células transfectadas con el pRc/CMVi no estimuladas; b y d, $P < 0,01$; c, $P < 0,05$ vs. células transfectadas con el pRc/CMVi y estimuladas con 8Br-AMPc, analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

A diferencia de lo observado en las células que sobre-expresan MKP-1, en las células transfectadas con la construcción pRc/CMVi-MKP-1(as) o con el siRNA de MKP-1 se evidenció un aumento significativo en la actividad de luciferasa respecto de las células transfectadas con el plásmido vacío, siendo mayor el aumento de la actividad del promotor en las células transfectadas con el siRNA (pRc/CMVi = $1,61 \pm 0,19$ vs. MKP-1(as) = $2,28 \pm 0,14$; vs. siRNA-MKP-1 = $2,79 \pm 0,19$, en unidades relativas, $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente) (Figura 47).

De estos estudios se deduce que en células de Leydig de la línea MA-10, la inducción de NUR77 por AMPc es dependiente de la actividad de ERK1/2, dado que la inactivación de esta quinasa, ya sea por la presencia de un inhibidor de su activación o por la sobre-expresión de MKP-1, disminuye significativamente la actividad del promotor de NUR77.

En conjunto los resultados descritos en las secciones anteriores sugieren que el efecto inhibitorio de MKP-1 sobre la transcripción de StAR se debe, al menos en parte, a una menor expresión de NUR77. Sin embargo no descartamos que la expresión de MKP-1 también reduzca el efecto de la hormona sobre el grado de fosforilación del factor SF-1.

Por otra parte aquí mostramos que variaciones en la expresión de MKP-1 se traducen en variaciones en los niveles de esteroides producidos y son compatibles con un rol de MKP-1 en el cierre de la acción hormonal sobre la esteroidogénesis.

II.3. c. Efecto de MKP-1 sobre la actividad del promotor del CYP11A1

Otro gen involucrado en la esteroidogénesis y regulado por hCG/AMPc es el CYP11A1 que codifica para la enzima P450_{SCC}, responsable de la conversión de colesterol a pregnenolona. A continuación evaluamos el efecto de la sobre-expresión o inhibición de la expresión de MKP-1 sobre la actividad del promotor del CYP11A1 con la misma estrategia que se utilizó para evaluar la actividad del promotor de StAR y de NUR77.

Primeramente analizamos, al igual que para el caso de los promotores de StAR y NUR77, la participación de ERK1/2 sobre la actividad del promotor del CYP11A1. En este caso las células fueron transfectadas con el vector pGL3-CYP11A1, el cual contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de CYP11A1. A continuación las células fueron estimuladas con AMPc durante 12 horas y procesadas para determinar la actividad de luciferasa.

En concordancia con lo descrito en bibliografía, observamos un incremento en la actividad del promotor del CYP11A1 por 8Br-AMPc (Figura 48). Este aumento resultó ser completamente dependiente de la actividad de ERK1/2 dado que la presencia de PD98059 bloqueó totalmente el efecto del AMPc sobre la actividad de este promotor (Figura 48).

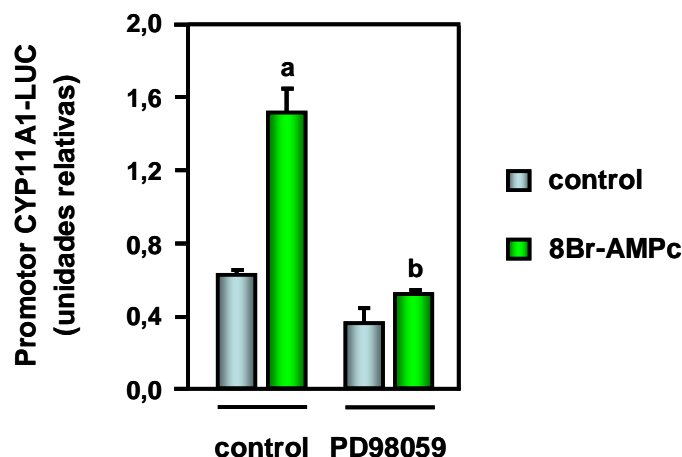


Figura 48. Efecto de la inhibición de ERK1/2 sobre la actividad del promotor de CYP11A1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector pGL3-CYP11A1 y el plásmido pRL. Al día siguiente las células fueron deprivadas de suero por 24 horas y preincubadas en presencia o ausencia de PD98059 (50 μ M) y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante 12 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se midió la actividad de luciferasa. Cada valor fue normalizado respecto a la actividad de luciferasa de *Renilla*. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas en ausencia de PD98059; b, $P < 0,001$ vs. células estimuladas con 8Br-AMPC en ausencia de PD98059, analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

A continuación evaluamos el efecto de la sobre-expresión del ADNc de MKP-1 sentido y antisentido sobre la actividad del promotor del CYP11A1. Se siguió el mismo protocolo de co-transfección utilizado para StAR y NUR77, pero en este caso se utilizó el plásmido pGL3-CYP11A1 en conjunto con los vectores correspondientes para aumentar o inhibir la expresión de MKP-1. Luego las células fueron estimuladas con 8Br-AMPC durante 12 horas y al término de esto, procesadas para la determinación de la actividad de luciferasa.

Los experimentos demostraron que la sobre-expresión de MKP-1 reduce el efecto del AMPc sobre este promotor (Figura 49). En efecto, en células estimuladas que sobre-expresan MKP-1 observamos una disminución significativa de la actividad de luciferasa respecto de las células transfectadas con el plásmido vacío (pRc/CMVi = $2,73 \pm 0,35$ vs. MKP-1(s) = $1,70 \pm 0,40$, en unidades relativas, $P < 0,01$).

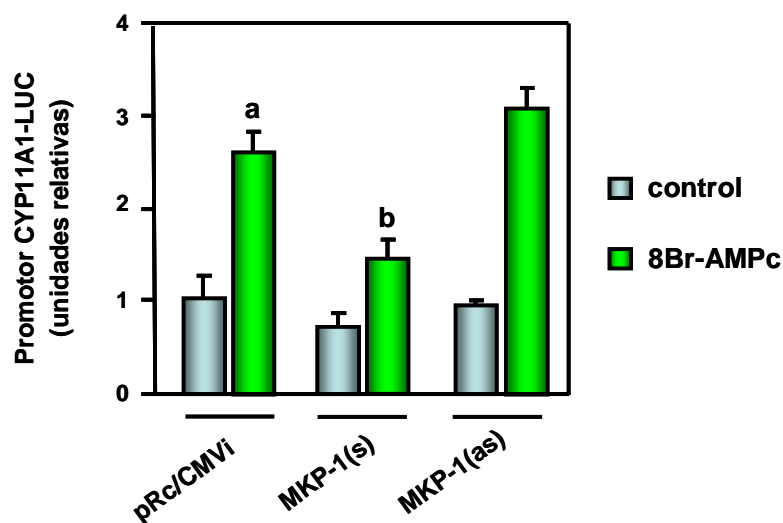


Figura 49. Efecto de la sobre-expresión o inhibición de MKP-1 sobre la actividad del promotor de CYP11A1 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector pGL3-CYP11A1 y el plásmido control pRL junto al vector pRc/CMVi vacío o pRc/CMVi-MKP-1 sentido (MKP-1(s)) o antisentido (MKP-1(as)). Al día siguiente fueron deprivadas de suero por 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) durante 12 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se midió la actividad de luciferasa. Cada valor fue normalizado respecto la actividad de luciferasa de *Renilla*. Los datos están expresados como el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células transfectadas con el pRc/CMVi controles no estimuladas; b, $P < 0,01$ vs. células transfectadas con el pRc/CMVi y estimuladas con 8Br-AMPC, analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

En conjunto los resultados de esta parte del trabajo muestran que MKP-1 impacta negativamente sobre la expresión y/o actividad de genes cuyos productos tienen un papel de relevancia en la esteroidogénesis. La inducción de MKP-1 por acción de las hormonas esteroidogénicas, evento que temporalmente está desfasado respecto de la activación de ERK1/2, permitiría acotar los efectos de LH/AMPC sobre la transcripción de genes como el de StAR.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

I. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POST-TRADUCCIONAL DE MKP-1 EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

En las células, el balance entre las actividades de proteínas quinasas y proteínas fosfatasas determina el grado de fosforilación de las proteínas. Inicialmente se consideraba que la función de las proteínas fosfatasas en los mecanismos de transducción de señales se limitaba al cierre de la señal disparada por el estímulo. Sin embargo este concepto ha cambiado drásticamente, gracias al importante avance en el conocimiento de las proteínas fosfatasas en la última década. Actualmente se acepta que ambas enzimas, quinasas y fosfatasas, tienen la misma relevancia en los mecanismos de transducción de señales en los cuales participan. Prueba de ello son los numerosos trabajos recientes que muestran evidencias contundentes acerca del rol fundamental que cumplen las fosfatasas en procesos fisiológicos tan diversos como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la inflamación.

La caracterización de los mecanismos de transducción de señales que operan mediante la activación de proteínas quinasas demuestra que, en muchos casos, la fosforilación de proteínas puede desencadenar la desfosforilación de otras. El ejemplo más sencillo sería la activación de una proteína fosfatasa por fosforilación. Trabajos de nuestro laboratorio ilustran lo discutido. El análisis de los mecanismos de transducción de señales disparados por las hormonas esteroideogénicas ACTH y LH demostró que estas hormonas, actuando a través de la activación de PKA, promueven la activación de proteínas tirosina fosfatasas y la consecuente desfosforilación de proteínas endógenas, una de ellas identificada como la proteína del citoesqueleto paxilina [228]. Más aún, estos trabajos revelaron que la desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina es un evento necesario en la acción de estas hormonas sobre la esteroideogénesis [223, 228, 238]. Más recientemente nuestro grupo demostró que estas hormonas también promueven, en células adrenocorticales, la inducción de MKP-1, una fosfatasa dual que interviene en la inactivación de las MAPKs [107]. Estos antecedentes ponen en evidencia la importancia de caracterizar las proteínas con actividad de tirosina fosfatasas que exhiben actividad y/o expresión dependiente de hormonas en tejidos esteroideogénicos, entre ellas las MKPs.

Este trabajo de Tesis fue desarrollado con el objetivo de contribuir al conocimiento de los mecanismos que controlan la expresión y actividad de una fosfatasa de actividad dual, MKP-1. Además, en base a los antecedentes mencionados que muestran la inducción de MKP-1 en células esteroideogénicas por acción hormonal, nos propusimos determinar si esta fosfatasa cumple un rol en la regulación de la síntesis de hormonas esteroides.

Habíamos demostrado que la estimulación con 8Br-AMPC incrementa los niveles del ARNm de MKP-1 en células de Leydig MA-10 [230]. Este resultado era coincidente con lo documentado previamente en células adrenocorticales, en las cuales la estimulación con ACTH producía el mismo efecto a través de una acción principalmente a nivel transcripcional [107]. En este trabajo de tesis observamos que la estimulación hormonal de las células MA-10 también induce un incremento en los niveles de la proteína MKP-1 y en su correspondiente ARNm. La cinética de inducción del mensajero fue coincidente con lo observado en otros sistemas y conforme a lo esperado para un gen de expresión temprana [248]. Más aún, comprobamos que el aumento de los niveles del mensajero por acción hormonal se debe principalmente a un incremento en la síntesis del mismo, como describimos en el sistema adrenal/ACTH [107].

La estimulación hormonal provoca un aumento en los niveles de la proteína. Al analizar la localización subcelular de MKP-1 observamos su localización en el núcleo, un resultado esperable de acuerdo a lo descrito previamente. En cambio resultó llamativo e interesante determinar la presencia de MKP-1 en mitocondrias, aunque puedan ser necesarios estudios más exhaustivos para confirmar este resultado. Sin embargo hay antecedentes que describen la localización de MKP-1 en esa organela [95]. Inclusive hay trabajos que describen la localización de ERK1/2 en mitocondria [249] y en particular, en células de Leydig MA-10 un trabajo de nuestro grupo demostró la presencia tanto de ERK1/2 como de MEK1/2 y la activación de las mismas por estímulo hormonal [50]. En este caso se observó una rápida cinética de desfosforilación de ERK1/2 luego de alcanzar la máxima activación por estimulación hormonal, aún a tiempos cuando las quinasas MEK1/2 permanecen activas. Esta observación sería compatible con la presencia en mitocondria de una fosfatasa activa y específica para ERK1/2 en el momento cuando comienza a prevalecer su desfosforilación. Resultaría interesante demostrar si esa fosfatasa es MKP-1, particularmente en células productoras de esteroides, por el hecho de que la actividad de

ERK1/2 en ese compartimento es necesaria para la activación de la proteína StAR, cuya relevancia en la esteroidogénesis ya hemos mencionado.

Resultó llamativo el hecho de que nuestros experimentos mostraban niveles elevados de la proteína MKP-1 a las 3 horas de estimulación, aún cuando la cinética de inducción transcripcional mostraba un descenso en los niveles del mensajero mucho más rápido. Estas observaciones nos llevaron a pensar que hCG/AMPc podría inducir cambios en la estabilidad de la proteína, en concordancia con lo demostrado por Brondello y col. Estos autores demostraron que la activación de ERK1/2 por distintos compuestos conduce a la fosforilación y estabilización de MKP-1 por parte de esta quinasa en fibroblastos de ratón [108].

Para poder analizar la posible regulación post-traducciona l de esta proteína, la estrategia seguida fue analizar los efectos de la estimulación hormonal sobre los niveles de la proteína en células transfectadas con un vector que permite la expresión constitutiva de la proteína recombinante flag-MKP-1. La disponibilidad de un anticuerpo anti-flag nos permitió evaluar los niveles de la proteína quimera y diferenciar estos niveles de los que corresponden a la proteína endógena. Con esta metodología podemos atribuir los cambios inducidos por hCG/AMPc en los niveles de MKP-1 a una acción a nivel post-traducciona l. Esto nos permitió comprobar que la estimulación de las células produce un incremento en los niveles de la proteína que alcanza un valor máximo (aproximadamente 10 veces respecto del control) luego de 1 hora de estimulación. Similares resultados se observaron en células adrenocorticales Y1 estimuladas con ACTH.

Por otra parte observamos que la incubación de las células MA-10 y Y1 con inhibidores del proteasoma conduce a la acumulación de la proteína, en concordancia con lo descrito en otros sistemas donde se demuestra la participación de este sistema multienzimático en la degradación de MKP-1 [108, 113].

Varios trabajos demuestran que los glucocorticoides inducen MKP-1 por distintos mecanismos, un conocimiento que ha suscitado mucho interés por las implicancias médicas que presenta [250-252]. Dado que las células de Leydig MA-10 producen progesterona como esteroide mayoritario, analizamos si el efecto de la estimulación con la hormona o el segundo mensajero sobre los niveles de la proteína MKP-1 podía ser mediado por la progesterona liberada al medio. Esta posibilidad fue descartada ya que la incubación de las

células con una concentración del esteroide similar a la que se alcanza en el medio de cultivo cuando se estimulan las células en las condiciones de nuestros experimentos no aumenta los niveles de la proteína recombinante (datos no mostrados).

Nuestros resultados, sumados al hecho de que se ha demostrado la fosforilación y estabilización de MKP-1 por acción de ERK1/2 en otros sistemas, promovieron nuestro interés en determinar el papel de PKA y ERK1/2 en la regulación post-traducciona de MKP-1 por hCG y ACTH. En células de Leydig MA-10, la activación de ERK1/2 por hCG es dependiente de PKA [253]. Incluso nuestros estudios indican que lo mismo sucede en células adrenocorticales de la línea Y1 ante el estímulo con ACTH, aunque al respecto hay algunas controversias [152]. En este trabajo de tesis observamos que la inhibición de la actividad de PKA anula la acumulación de MKP-1 promovida por hCG/AMPc, lo cual sugiere que otras quinasas, como PKC, no participan mayormente en este mecanismo. Más bien nuestros resultados señalan que este efecto hormonal involucra principalmente la actividad de ERK1/2.

Al analizar la fosforilación de MKP-1 en células intactas comprobamos que tanto hCG como AMPc promueven la fosforilación de MKP-1. Esto, sumado a que cuando se bloquea la activación de ERK1/2 se anula completamente la incorporación de ^{32}Pi en la proteína sugiere que la hormona hCG induce la fosforilación de MKP-1 no por una acción directa de PKA sino mediante la acción de la MAP quinasa ERK1/2. La fosforilación de MKP-1 se vio también en otro tipo de células esteroideogénicas, como las células adrenocorticales humanas de la línea H295R. La estimulación de estas células con AMPc también provoca la fosforilación de MKP-1, aunque en este trabajo no se estableció si esto ocurre por una acción directa de PKA o a través de otra quinasa [231].

El análisis de la secuencia aminoacídica de MKP-1 revela varios potenciales sitios consenso de fosforilación por diferentes quinasas, sin embargo la fosforilación en células intactas se restringe a un número limitado de sitios, entre ellos las serinas del extremo carboxilo terminal 359 y 364. La fosforilación en estos sitios por acción de ERK1/2 impide la degradación por el proteasoma [108]. Sin embargo un trabajo reciente realizado en células de una línea derivada de riñón de embrión de mono, describe la fosforilación de MKP-1 en otros sitios. Este trabajo muestra que la estimulación con suero induce la fosforilación en las serinas 296 y 323, las cuales se localizan adyacentes al extremo amino del dominio de

interacción con ERK, o dominio DEF [99]. En estos estudios se demuestra que la activación de ERK1/2 inducida por suero promueve la fosforilación de MKP-1 en la serina 296 y concomitantemente, la ubiquitinación y degradación de la proteína. Estos resultados se contraponen a los descritos por Brondello y col [108]. Es evidente que diferentes condiciones de estimulación y/o tipos celulares pueden causar efectos diferentes sobre la proteína MKP-1. En particular nuestros hallazgos están en concordancia con los que describen la fosforilación y estabilización de MKP-1. Postulamos que la fosforilación de MKP-1 en células esteroideogénicas ocurre, al menos predominantemente, en las serinas 359 y 364. Mediante experimentos de mutagénesis sitio dirigida recientemente hemos obtenido la doble mutante de flag-MKP-1 en donde ambos sitios de fosforilación han sido sustituidos por un aminoácido no fosforilable como es la alanina (S359/364A). Ensayos con esta construcción nos permitirán establecer con mayor certeza los sitios de fosforilación de MKP-1 ante el estímulo con hCG/AMPc.

Las investigaciones que llevamos a cabo sugieren que el bloqueo de la activación de ERK1/2 tiene efectos cuantitativamente diferentes sobre la estabilización y sobre la fosforilación de la proteína. Al bloquear la activación de ERK1/2 provocada por AMPc con un inhibidor de MEK1/2, en condiciones establecidas para el bloqueo total de la actividad de estas quinasas, se anula la fosforilación de MKP-1. Sin embargo en las células estimuladas en presencia del mismo inhibidor (PD98059) aún se acumula MKP-1. Aunque aún es especulativo esto podría indicar que, además de la fosforilación, otras modificaciones post-traduccionales inducidas por la hormona contribuyen a la estabilización de la proteína, cuyo análisis resultaría interesante.

El análisis de la secuencia aminoacídica de MKP-1 revela sitios consenso de acetilación y sumoilación. Como mencionamos en la introducción, investigaciones recientes demuestran que la estimulación de células de una línea celular de monocitos con lipopolisacáridos induce la acetilación de MKP-1 [115]. Esta modificación ocurre en la lisina 57 y es dependiente de la actividad de la acetilasa p300. En este contexto resulta interesante destacar el hecho de que en células adrencorticales Y1 la estimulación con ACTH provoca la inducción del gen que codifica para el receptor de ACTH (gen Mc2r) mediante un mecanismo que involucra la interacción de diversos activadores y coactivadores de la transcripción, como SF-1, MKP-1 y la acetilasa p300 entre otros [224].

La unión covalente de SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) a proteínas es una modificación post-traducciona que regula varios procesos celulares, siendo la participación en la regulación de la expresión génica uno de los más estudiados [254]. Por su localización nuclear y por el hecho de que su actividad promueve indirectamente la inactivación de factores de transcripción activados vía MAP quinasas, MKP-1 emerge como potencial blanco de sumoilación. Estos antecedentes nos llevan a postular que las hormonas esteroideogénicas podrían regular la sumoilación de MKP-1. Más aún, existiendo casos en donde la fosforilación promueve el intercambio sumoilación-ubiquitinación, resulta interesante proponer un modelo en el que ese intercambio sea inducido por hormonas esteroideogénicas.

Los resultados obtenidos en cuanto a la localización subcelular de MKP-1 sugieren la presencia de MKP-1 en mitocondria. Más aún, los experimentos de sobre-expresión de la proteína recombinante muestran que la estimulación con AMPc promueve su acumulación tanto en núcleo como en mitocondria aún a los 30 minutos de estimulación. Si esto es el resultado de una modificación post-traducciona promovida por la hormona que favorece la traslocación de la proteína a un compartimento particular es una hipótesis que resulta interesante analizar, más aún se propone que MKP-1 puede ser blanco de distintas modificaciones post-traduccionales. En este contexto cabe mencionar además que MKP-1, aunque considerada ampliamente como proteína nuclear, carece de la secuencia canónica de localización nuclear, y se postula que a través de una secuencia determinada interactúa con proteínas que la ubican en esa organela [91].

II. ROL DE MKP-1 EN LA ESTEROIDOGENESIS

Nuestros estudios demuestran que la expresión de MKP-1 es regulada por hormonas esteroideogénicas, lo cual nos lleva a preguntarnos entonces cuál es el rol fisiológico de la misma en las células esteroideogénicas. Dada la estricta regulación que LH/ACTH ejercen sobre MKP-1 se infiere que ésta podría cumplir un rol en la regulación de la producción de esteroides. La participación de una fosfatasa dual en la esteroideogénesis fue sugerida primeramente por Sewer y Waterman. Estos autores demostraron que la actividad de serina/treonina y tirosina fosfatasas es necesaria para la transcripción del gen hCYP17, el

cual codifica para la enzima 17 α -hidroxilasa. Estos experimentos demostraban que los inhibidores de serina/treonina y tirosina fosfatasas bloquean el efecto de ACTH sobre la actividad del promotor, y sobre los niveles del ARNm y de la proteína. Esto permitió postular por primera vez que una fosfatasa dual es necesaria para la expresión del gen hCYP17 [255]. Posteriormente los mismos autores demostraron que MKP-1 participa en ese proceso a través de un mecanismo que involucra la desfosforilación de SF-1 [231].

Sewer y Waterman postularon que la expresión de otros genes de la regulación hormonal crónica del proceso esteroidogénico y que son dependientes de SF-1 también requieren de la actividad de fosfatasas duales para su activación. En base a los resultados de experimentos en los que se usaron inhibidores de tirosina y serina/treonina fosfatasas exclusivamente, los autores postularon que una fosfatasa dual podría participar también en la inducción del CYP11A1. En efecto, ellos observaron que los inhibidores mencionados reducen el efecto del AMPc sobre los niveles del ARNm correspondiente [241].

Las investigaciones comentadas en el párrafo anterior indican que la regulación del CYP17, y eventualmente otros genes como CYP11A1, es diferente de la del gen de StAR, ya que se conoce que la inducción de StAR requiere de la fosforilación de SF-1 mediada por ERK1/2 [218]. Este efecto diferencial que produce la fosforilación de SF-1 sobre la transcripción de estos dos genes sugiere que la inducción de MKP-1 funcionaría como una señal mediante la cual las hormonas pueden simultáneamente cerrar la transcripción de StAR e iniciar la transcripción de genes de expresión tardía como por ejemplo el CYP17. En este trabajo analizamos los efectos de MKP-1 sobre la actividad del promotor del gen CYP11A1 estimulado por AMPc (12 hs) y contrariamente a lo esperado de acuerdo a los trabajos de Sewer y Waterman [231, 241], en nuestras condiciones experimentales observamos una inhibición de la actividad de este promotor en células que sobre-expresan MKP-1. Sin embargo para concluir acerca de la regulación del gen CYP11A1 por acción de MKP-1 se requiere un análisis más profundo. Incluso creemos que estos estudios merecen llevarse a cabo atendiendo al hecho que nuestros resultados recientes demuestran que hCG induce otras MKPs, como MKP-2 y MKP-3, las cuales exhiben una cinética de inducción mas tardía que MKP-1 y que también pueden modular la actividad de ERK1/2.

En el presente trabajo nos propusimos determinar el efecto de MKP-1 sobre la inducción hormonal de StAR. La estrategia consistió en aumentar la expresión de MKP-1 mediante la expresión transitoria de construcciones específicas en células de Leydig de la

línea MA-10. Nuestro planteo era que la sobre-expresión de MKP-1 reduciría el nivel de ERK1/2 fosforilada alcanzado por estimulación, lo cual rendiría una menor actividad de los factores de transcripción dependientes de ERK y necesarios para la expresión de StAR y, consecuentemente, una menor actividad del promotor de StAR, una menor expresión de StAR y una disminución en la producción de esteroides. Por el contrario, al suprimir la expresión de MKP-1 esperábamos observar efectos opuestos lo cual rendiría finalmente un incremento en la producción de esteroides.

Para anular la expresión de MKP-1 utilizamos la transfección de las células con un plásmido que contiene el ADNc antisentido de MKP-1, y en una etapa más avanzada de este trabajo, la transfección con un vector que expresa un siRNA específico de esta fosfatasa. La eficiencia de esta última estrategia para reducir la expresión de MKP-1 fue, aparentemente, mayor que la basada en la sobre-expresión del ADNc antisentido. Además se sabe que con esta metodología se logra mayor especificidad, lo cual es importante en nuestro caso ya que MKP-1 pertenece a una familia de proteínas de marcada homología de secuencia. Aunque la deprivación de suero de las células baja la expresión de estas fosfatasas, lo cual nos indicaba que sólo MKP-1 estaría presente en las células estimuladas, en el transcurso de este trabajo demostramos que luego de 3 horas de estimulación hCG y AMPc incrementan la expresión de otra MKP de localización nuclear, MKP-2. Por ese motivo incluimos en nuestro trabajo la metodología del siRNA para estudiar la participación de MKP-1 en la esteroidogénesis, particularmente en lo que se refiere a la transcripción de genes esteroidogénicos

Para evaluar el efecto de MKP-1 sobre la producción de esteroides optamos por tiempos de estimulación que no superaran las 3 horas de estimulación, para evitar los posibles efectos de MKP-2. Sin embargo, para poder evidenciar el efecto del bloqueo de la expresión de MKP-1 mediante la transfección del ADNc antisentido o del siRNA el tiempo de estimulación debía ser mayor al cual se produce el incremento del mensajero de MKP-1. Por el contrario, el efecto de la sobre-expresión podía ser evidenciado a distintos tiempos de estimulación, de acuerdo con nuestro razonamiento. Es precisamente mediante la sobre-expresión de MKP-1, más que con el bloqueo de su expresión, que se demuestra el papel de esta enzima como mecanismo de cierre de efectos transcripcionales. Por ejemplo uno de los trabajos que demuestran que la inducción de MKP-1 por distintos estímulos, adrenalina entre ellos, promueve el cese de la transcripción de los genes que esos

estímulos desencadenan en cardiomiocitos [256] se basa en la sobre-expresión de la MKP-1. Por todo lo expuesto en este trabajo optamos por evaluar la producción de esteroides a dos tiempos de estimulación: 30 minutos y 2 horas, tanto en células que sobre-expresan MKP-1 como en células transfectadas para anular el efecto inductor del estímulo (hCG o AMPc). A ambos tiempos ensayados la sobre-expresión de la proteína redujo la producción de esteroides estimulada por 8Br-AMPc. Por el contrario, el bloqueo de la expresión, con las dos metodologías ensayadas, incrementó la producción de esteroides sólo luego de 2 horas de estimulación y no a los 30 minutos. Estos resultados son consistentes con el hecho que el blanco de ambas metodologías es interferir con la síntesis del ARN mensajero de MKP-1 el cual se incrementa entre los 15 y 30 minutos de estimulación.

Para analizar el efecto de MKP-1 sobre la inducción transcripcional de StAR, evaluamos la actividad de luciferasa en células co-transfectadas con el vector pGL3-StAR, el cual contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de StAR, y el vector conteniendo el ADNc de MKP-1 (orientación sentido y antisentido) o el plásmido para generar el siRNA y su control. Cuando se evalúa la actividad del promotor de StAR mediante el ensayo del gen reportero como el que empleamos se obtiene una máxima respuesta ante la estimulación hormonal luego de 12-14 horas de estimulación. En nuestro caso fue necesario reducir estos tiempos para evitar la posible inducción de otras fosfatasas. Luego de esta puesta a punto del ensayo del gen reportero establecimos en 6 horas el tiempo óptimo de estimulación de las células co-transfectadas para evaluar la actividad del promotor de StAR.

Los resultados que obtuvimos mostraron que los altos niveles de MKP-1 presentes desde el inicio de la estimulación mediante la transfección del ADNc correspondiente, disminuyen la actividad del promotor de StAR. En contraste, observamos un aumento en la actividad del promotor ante el estímulo hormonal en células donde se anula la expresión de MKP-1 pero sólo cuando se empleó la metodología del siRNA. Es probable que esto se deba a la mayor capacidad del siRNA para bloquear la expresión específica de MKP-1, respecto de la metodología del ADNc antisentido.

Consistente con el hecho de que la fosforilación mediada por ERK1/2 se requiere para la activación/expresión de factores de transcripción necesarios para la expresión de StAR, observamos que cuando se bloquea la activación de ERK1/2 con el compuesto PD98059 se reduce efectivamente la actividad del promotor de StAR, pero la magnitud de tal

reducción es máxima cuando el inhibidor se agrega junto con el estímulo que dispara la activación del promotor. Cuando este inhibidor se agrega luego de transcurridas 2 horas de estimulación no se puede ver su efecto inhibitorio sobre la actividad del promotor de StAR inducida por 8Br-AMPC, al menos en las condiciones experimentales ensayadas que incluye un tiempo de estimulación de 6 horas. En este aspecto hay que tener en cuenta que el efecto de esta transfección del ADNc antisentido o el siRNA es interferir con la expresión de la proteína endógena, un evento temporalmente desplazado de la activación de ERK1/2 que se evidencia a los 5 minutos de estimulación. Por lo tanto la consiguiente fosforilación de factores de transcripción dependientes de ERK1/2 tendrá lugar antes que se evidencie la reducción en los niveles de expresión de la MKP-1 endógena. Es por eso que para detectar los efectos de la supresión de la expresión de MKP-1 sobre la actividad de promotores debimos optimizar el tiempo de estimulación y a su vez utilizar la estrategia del siRNA, la cual es específica y eficiente en disminuir la expresión de MKP-1.

Cuando se evalúa el efecto de MKP-1 sobre la expresión de StAR es necesario tener presente que no sólo SF-1 es susceptible de la regulación mediada por MAPKs y MKPs. DAX-1 es un factor inhibitorio de la transcripción de StAR cuyos niveles de expresión han sido descritos como dependientes de ERK1/2 [257]. Está descrito que en células esteroideogénicas los mismo estímulos que inducen el gen de SF-1 también actúan induciendo el gen de DAX-1, con la diferencia que la expresión de este último es más tardía. Esto se debe a que el promotor de DAX-1 presenta sitios consenso de reconocimiento para SF-1 y por lo tanto requiere de éste para su inducción [258]. Por lo tanto la sobre-expresión de MKP-1 puede afectar la actividad del promotor de StAR por dos mecanismos con efectos opuestos: inhibe la acción de SF-1 sobre el promotor de StAR y baja los niveles del factor inhibitorio DAX-1. En el balance de esos dos efectos opuestos predomina el efecto sobre la activación del promotor por SF-1, a juzgar por los resultados alcanzados en este trabajo.

Como se mencionó en la introducción, otro factor de transcripción que interviene en la inducción del gen de StAR y otros genes de la respuesta esteroideogénica es NUR77 [208, 210]. Se sabe que la actividad de este factor, al igual que el SF-1, se regula por fosfo/desfosforilación. Se ha visto en células de Leydig que el AMPC promueve la inducción de NUR77 y la fosforilación de éste en la serina 340 y su desfosforilación en serina 350 [213], eventos que son necesarios para la inducción de StAR. Sin embargo, en el trabajo

mencionado, la participación de las MAPKs sobre la inducción y el estado de fosforilación de NUR77 no ha sido explorado con mayor detalle. Por otro lado en otros sistemas se sabe que la inducción y activación de NUR77 es dependiente de ERK1/2 [210, 217]. Por ejemplo la transactivación de NUR77 en corticotrofos por CRH/AMPC involucra la actividad de ERK1/2 además de PKA y calcio. Además se ha demostrado la fosforilación *in vivo* de NUR77 en la serina 105 por acción de ERK y que la fosforilación de este residuo tiene un rol relevante en la exportación de este factor del núcleo [259].

Si la inducción de NUR77 por AMPc en células esteroidogénicas es dependiente de ERK1/2, entonces la sobre-expresión de MKP-1 podría reducir la actividad del promotor de NUR77. Lo opuesto sería observable disminuyendo la expresión de la proteína endógena. Nuestros experimentos mostraron que el PD98059 reduce significativamente la estimulación del promotor de NUR77 por AMPc, sugiriendo que la vía de ERK1/2 participa en la inducción de este factor. En línea con este resultado determinamos que la sobre-expresión de MKP-1 reduce el efecto del AMPc sobre la actividad de NUR77, como ocurre con el promotor de StAR, y que el siRNA es efectivo para aumentar la actividad de este promotor.

En base a estos datos, suponemos que el efecto inhibitorio de MKP-1 sobre la inducción de StAR, podría deberse a una acción de la fosfatasa a dos niveles: disminuyendo el grado de fosforilación y activación de ciertos factores de transcripción e impidiendo la expresión de otros factores de transcripción, fundamentalmente de aquellos que requieren de la acción hormonal para su inducción. En este contexto resulta de interés mencionar que se ha demostrado que ACTH induce un perfil cíclico de fosforilación tanto de ERK1/2 como de SF-1 (serina 203), coincidente con un reclutamiento también cíclico de SF-1 y otros cofactores al promotor del gen *Mc2r* para promover su expresión [224]. En estos ciclos la inhibición de la expresión del gen *Mc2r* coincide temporalmente con la asociación de MKP-1 al complejo de correguladores/activadores que incluye al SF-1 en su forma desfosforilada. Si este modelo dinámico de regulación de SF-1 se aplica también a la inducción de StAR aún no está definido. Por esto, nuestros objetivos de trabajo futuros incluyen analizar la participación de MKP-1 en la fosforilación de SF-1 y NUR77 en células de Leydig MA-10

Por otro lado, la función de MKP-1 en la esteroidogénesis no se restringe solamente a sus acciones sobre la inducción/activación de factores de transcripción nucleares, que

luego serán reclutados a los promotores de genes esteroideogénicos. También especulamos que esta fosfatasa pueda actuar a nivel mitocondrial, alterando el estado de fosforilación de la proteína StAR y por ende de esta forma, regular el proceso de síntesis de esteroides. Como se comentó en la introducción, un trabajo de nuestro grupo demostró la existencia de un complejo multienzimático en las mitocondrias que regula el estado de fosforilación de StAR. En este complejo actuarían las quinasas MEK y ERK1/2. Dada las evidencias que sustentan la presencia de MKP-1 en este compartimento subcelular [95], sería interesante demostrar que efectivamente MKP-1 se localiza también en las mitocondrias de células esteroideogénicas, regulando la actividad de StAR y por lo tanto demostrar que esta fosfatasa cumple un rol en la regulación de la síntesis de esteroides.

En síntesis, este trabajo demuestra por primera vez un rol de MKP-1 en la regulación de la esteroideogénesis en células de Leydig de la línea MA-10. Estos hallazgos conciben con el hecho que las hormonas esteroideogénicas LH/hCG y ACTH regulan estrictamente la expresión de esta fosfatasa por un efecto a nivel transcripcional como así también promoviendo modificaciones post-traduccionales que afectan la vida media de la proteína.

Futuros estudios que planeamos encarar nos darán respuesta si estas modificaciones post-traduccionales están relacionadas con la localización subcelular de la proteína y la relevancia funcional de estos fenómenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gorostizaga, A., Brion, L., Maloberti, P., Maciel, F.C., Podesta, E.J., Paz, C., *Heat shock triggers MAPK activation and MKP-1 induction in Leydig testicular cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327** (1): p. 23-28.
2. Morales, M.P., Galvez, A., Eltit, J.M., Ocaranza, P., Diaz-Araya, G., Lavandero, S., *IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270** (3): p. 1029-1035.
3. Epstein, L.F., Orme-Johnson, N.R., *Acute action of luteinizing hormone on mouse Leydig cells: accumulation of mitochondrial phosphoproteins and stimulation of testosterone synthesis*. Mol Cell Endocrinol, 1991. **81** (1-3): p. 113-126.
4. Podesta, E.J., Milani, A., Steffen, H., Neher, R., *Adrenocorticotropin (ACTH) induces phosphorylation of a cytoplasmic protein in intact isolated adrenocortical cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76** (10): p. 5187-5191.
5. Jurado, S., Sanchez-Prieto, J., Torres, M., *Elements of the nitric oxide/cGMP pathway expressed in cerebellar granule cells: biochemical and functional characterisation*. Neurochem Int, 2004. **45** (6): p. 833-843.
6. Kelly, M.J., Ronnekleiv, O.K., *Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **290** (1-2): p. 14-23.
7. Carraway, K.L., 3rd, Sliwkowski, M.X., Akita, R., Platko, J.V., Guy, P.M., Nuijens, A., Diamonti, A.J., Vandlen, R.L., Cantley, L.C., Cerione, R.A., *The erbB3 gene product is a receptor for heregulin*. J Biol Chem, 1994. **269** (19): p. 14303-14306.
8. Schlessinger, J., Lemmon, M.A., *Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring*. Cell, 2006. **127** (1): p. 45-48.
9. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D.S., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. Gene, 2006. **366** (1): p. 2-16.
10. Lefkowitz, R.J., *Seven transmembrane receptors: something old, something new*. Acta Physiol (Oxf), 2007. **190** (1): p. 9-19.
11. Milligan, G., Kostenis, E., *Heterotrimeric G-proteins: a short history*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S46-55.
12. Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B., *Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein*. Nature, 1994. **369** (6482): p. 621-628.
13. Sugden, P.H., Clerk, A., *Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors*. Cell Signal, 1997. **9** (5): p. 337-351.

14. Ihle, J.N., *The Janus kinase family and signaling through members of the cytokine receptor superfamily*. Proc Soc Exp Biol Med, 1994. **206** (3): p. 268-272.
15. Shchemelinin, I., Sefc, L., Necas, E., *Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases*. Folia Biol (Praha), 2006. **52** (3): p. 81-100.
16. Aaronson, S.A., Rubin, J.S., Finch, P.W., Wong, J., Marchese, C., Falco, J., Taylor, W.G., Kraus, M.H., *Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142** (6 Pt 2): p. S7-10.
17. Heldin, C.H., *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. Cell, 1995. **80** (2): p. 213-223.
18. Pawson, T., Gish, G.D., *SH2 and SH3 domains: from structure to function*. Cell, 1992. **71** (3): p. 359-362.
19. Bork, P., Margolis, B., *A phosphotyrosine interaction domain*. Cell, 1995. **80** (5): p. 693-694.
20. Ruff-Jamison, S., Chen, K., Cohen, S., *Epidermal growth factor induces the tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of Stat 5 in mouse liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92** (10): p. 4215-4218.
21. Vignais, L., Oumesmar, B.N., Baron-Van Evercooren, A.B., *PDGF-alpha receptor is expressed by mature neurones of the central nervous system*. Neuroreport, 1995. **6** (15): p. 1993-1996.
22. Kang, J.S., Liu, C., Derynck, R., *New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function*. Trends Cell Biol, 2009. **19** (8): p. 385-394.
23. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif, 2003. **36** (3): p. 131-149.
24. Langevin, H.M., Bouffard, N.A., Badger, G.J., Iatridis, J.C., Howe, A.K., *Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch ex vivo and in vivo*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288** (3): p. C747-756.
25. Sedej, S., Rose, T., Rupnik, M., *cAMP increases Ca²⁺-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices*. J Physiol, 2005. **567** (Pt 3): p. 799-813.
26. Skalhegg, B.S., Tasken, K., *Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA*. Front Biosci, 2000. **5**: p. D678-693.

27. Smith, F.D., Scott, J.D., *Anchored cAMP signaling: onward and upward - a short history of compartmentalized cAMP signal transduction*. Eur J Cell Biol, 2006. **85** (7): p. 585-592.
28. Jarnaess, E., Tasken, K., *Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes*. Biochem Soc Trans, 2007. **35** (Pt 5): p. 931-937.
29. Schaeffer, H.J., Weber, M.J., *Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers*. Mol Cell Biol, 1999. **19** (4): p. 2435-2444.
30. Roux, P.P., Blenis, J., *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68** (2): p. 320-344.
31. Raman, M., Chen, W., Cobb, M.H., *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene, 2007. **26** (22): p. 3100-3112.
32. Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. Cell, 1991. **65** (4): p. 663-675.
33. Meloche, S., Pouyssegur, J., *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition*. Oncogene, 2007. **26** (22): p. 3227-3239.
34. Ip, Y.T., Davis, R.J., *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10** (2): p. 205-219.
35. Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., Davis, R.J., *Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors*. Embo J, 1996. **15** (11): p. 2760-2770.
36. Ashwell, J.D., *The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2006. **6** (7): p. 532-540.
37. Obata, T., Brown, G.E., Yaffe, M.B., *MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway*. Crit Care Med, 2000. **28** (4 Suppl): p. N67-77.
38. Abraham, E., *Alterations in cell signaling in sepsis*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 7**: p. S459-464.
39. Kyriakis, J.M., Avruch, J., *Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines*. Bioessays, 1996. **18** (7): p. 567-577.
40. Tanoue, T., Nishida, E., *Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades*. Pharmacol Ther, 2002. **93** (2-3): p. 193-202.

41. Kolch, W., *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*. *Biochem J*, 2000. **351 Pt 2**: p. 289-305.
42. Therrien, M., Michaud, N.R., Rubin, G.M., Morrison, D.K., *KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade*. *Genes Dev*, 1996. **10** (21): p. 2684-2695.
43. Morrison, D.K., *KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway?* *J Cell Sci*, 2001. **114** (Pt 9): p. 1609-1612.
44. Schaeffer, H.J., Catling, A.D., Eblen, S.T., Collier, L.S., Krauss, A., Weber, M.J., *MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade*. *Science*, 1998. **281** (5383): p. 1668-1671.
45. Teis, D., Wunderlich, W., Huber, L.A., *Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction*. *Dev Cell*, 2002. **3** (6): p. 803-814.
46. Uhlik, M.T., Abell, A.N., Johnson, N.L., Sun, W., Cuevas, B.D., Lobel-Rice, K.E., Horne, E.A., Dell'Acqua, M.L., Johnson, G.L., *Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5** (12): p. 1104-1110.
47. Schoorlemmer, J., Goldfarb, M., *Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 2002. **277** (51): p. 49111-49119.
48. Saxena, M., Mustelin, T., *Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase*. *Semin Immunol*, 2000. **12** (4): p. 387-396.
49. Zuniga, A., Torres, J., Ubeda, J., Pulido, R., *Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm*. *J Biol Chem*, 1999. **274** (31): p. 21900-21907.
50. Poderoso, C., Converso, D.P., Maloberti, P., Duarte, A., Neuman, I., Galli, S., Maciel, F.C., Paz, C., Carreras, M.C., Poderoso, J.J., Podesta, E.J., *A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis*. *PLoS One*, 2008. **3** (1): p. e1443.
51. Enslin, H., Davis, R.J., *Regulation of MAP kinases by docking domains*. *Biol Cell*, 2001. **93** (1-2): p. 5-14.
52. Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., Nishida, E., *A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2** (2): p. 110-116.
53. Tanoue, T., Yamamoto, T., Nishida, E., *Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases*. *J Biol Chem*, 2002. **277** (25): p. 22942-22949.

-
54. Fantz, D.A., Jacobs, D., Glossip, D., Kornfeld, K., *Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues*. J Biol Chem, 2001. **276** (29): p. 27256-27265.
 55. Murphy, L.O., Smith, S., Chen, R.H., Fingar, D.C., Blenis, J., *Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products*. Nat Cell Biol, 2002. **4** (8): p. 556-564.
 56. Cohen, P.T., *Protein phosphatase 1--targeted in many directions*. J Cell Sci, 2002. **115** (Pt 2): p. 241-256.
 57. Barford, D., *Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases*. Trends Biochem Sci, 1996. **21** (11): p. 407-412.
 58. Virshup, D.M., Shenolikar, S., *From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover*. Mol Cell, 2009. **33** (5): p. 537-545.
 59. Brady, M.J., Saltiel, A.R., *The role of protein phosphatase-1 in insulin action*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 157-173.
 60. Berndt, N., *Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D22-42.
 61. Morfini, G., Szebenyi, G., Brown, H., Pant, H.C., Pigino, G., DeBoer, S., Beffert, U., Brady, S.T., *A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons*. Embo J, 2004. **23** (11): p. 2235-2245.
 62. Bridges, D., MacDonald, J.A., Wadzinski, B., Moorhead, G.B., *Identification and characterization of D-AKAP1 as a major adipocyte PKA and PP1 binding protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346** (1): p. 351-357.
 63. Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I., *Mitotic phosphatases: no longer silent partners*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18** (6): p. 623-631.
 64. Chen, W., Possemato, R., Campbell, K.T., Plattner, C.A., Pallas, D.C., Hahn, W.C., *Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation*. Cancer Cell, 2004. **5** (2): p. 127-136.
 65. Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T., Rao, A., *The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun*. Nature, 1993. **365** (6444): p. 352-355.
 66. Janssens, V., Goris, J., *Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling*. Biochem J, 2001. **353** (Pt 3): p. 417-439.
 67. Ragolia, L., Begum, N., *Protein phosphatase-1 and insulin action*. Mol Cell Biochem, 1998. **182** (1-2): p. 49-58.

-
68. Xie, H., Clarke, S., *Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain*. J Biol Chem, 1994. **269** (3): p. 1981-1984.
69. Charbonneau, H., Tonks, N.K., *1002 protein phosphatases?* Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 463-493.
70. Stoker, A.W., *Protein tyrosine phosphatases and signalling*. J Endocrinol, 2005. **185** (1): p. 19-33.
71. Tonks, N.K., *Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7** (11): p. 833-846.
72. Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T., *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. Cell, 2004. **117** (6): p. 699-711.
73. Dickinson, R.J., Keyse, S.M., *Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases*. J Cell Sci, 2006. **119** (Pt 22): p. 4607-4615.
74. Camps, M., Nichols, A., Arkinstall, S., *Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function*. FASEB J, 2000. **14** (1): p. 6-16.
75. Streuli, M., *Protein tyrosine phosphatases in signaling*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8** (2): p. 182-188.
76. Garton, A.J., Tonks, N.K., *PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation*. Embo J, 1994. **13** (16): p. 3763-3771.
77. Wang, J., Bixby, J.L., *Receptor tyrosine phosphatase-delta is a homophilic, neurite-promoting cell adhesion molecular for CNS neurons*. Mol Cell Neurosci, 1999. **14** (4-5): p. 370-384.
78. Tao, J., Malbon, C.C., Wang, H.Y., *Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo*. J Biol Chem, 2001. **276** (31): p. 29520-29525.
79. Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C., Kasuga, M., *Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains*. J Biol Chem, 1994. **269** (16): p. 12220-12228.
80. Seely, B.L., Staubs, P.A., Reichart, D.R., Berhanu, P., Milarski, K.L., Saltiel, A.R., Kusari, J., Olefsky, J.M., *Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor*. Diabetes, 1996. **45** (10): p. 1379-1385.
81. Bandyopadhyay, D., Kusari, A., Kenner, K.A., Liu, F., Chernoff, J., Gustafson, T.A., Kusari, J., *Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo*

- and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *J Biol Chem*, 1997. **272** (3): p. 1639-1645.
82. Flint, A.J., Gebbink, M.F., Franza, B.R., Jr., Hill, D.E., Tonks, N.K., *Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation*. *Embo J*, 1993. **12** (5): p. 1937-1946.
83. Chen, J., Parsons, S., Brautigan, D.L., *Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts*. *J Biol Chem*, 1994. **269** (11): p. 7957-7962.
84. Ali, S., Ali, S., *Recruitment of the protein-tyrosine phosphatase SHP-2 to the C-terminal tyrosine of the prolactin receptor and to the adaptor protein Gab2*. *J Biol Chem*, 2000. **275** (50): p. 39073-39080.
85. Rocchi, S., Gaillard, I., van Obberghen, E., Chambaz, E.M., Vilgrain, I., *Adrenocorticotrophic hormone stimulates phosphotyrosine phosphatase SHP2 in bovine adrenocortical cells: phosphorylation and activation by cAMP-dependent protein kinase*. *Biochem J*, 2000. **352 Pt 2**: p. 483-490.
86. Rhee, S.H., Jones, B.W., Toshchakov, V., Vogel, S.N., Fenton, M.J., *Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages*. *J Biol Chem*, 2003. **278** (25): p. 22506-22512.
87. Bilwes, A.M., den Hertog, J., Hunter, T., Noel, J.P., *Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization*. *Nature*, 1996. **382** (6591): p. 555-559.
88. Keyse, S.M., Emslie, E.A., *Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase*. *Nature*, 1992. **359** (6396): p. 644-647.
89. Rohan, P.J., Davis, P., Moskaluk, C.A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U., Kelly, K., *PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase*. *Science*, 1993. **259** (5102): p. 1763-1766.
90. Kawajiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K., Tachibana, M., Morohashi, K., *Role of the LXXLL-motif and activation function 2 domain in subcellular localization of Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1)*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17** (6): p. 994-1004.
91. Wu, J.J., Zhang, L., Bennett, A.M., *The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25** (11): p. 4792-4803.
92. Groom, L.A., Sneddon, A.A., Alessi, D.R., Dowd, S., Keyse, S.M., *Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase*. *Embo J*, 1996. **15** (14): p. 3621-3632.

-
93. Dowd, S., Sneddon, A.A., Keyse, S.M., *Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases.* J Cell Sci, 1998. **111** (Pt **22**): p. 3389-3399.
94. Tanoue, T., Yamamoto, T., Maeda, R., Nishida, E., *A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs.* J Biol Chem, 2001. **276** (28): p. 26629-26639.
95. Rosini, P., De Chiara, G., Bonini, P., Lucibello, M., Marcocci, M.E., Garaci, E., Cozzolino, F., Torcia, M., *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, 2004. **279** (14): p. 14016-14023.
96. Castelli, M., Camps, M., Gillieron, C., Leroy, D., Arkininstall, S., Rommel, C., Nichols, A., *MAP kinase phosphatase 3 (MKP3) interacts with and is phosphorylated by protein kinase CK2alpha.* J Biol Chem, 2004. **279** (43): p. 44731-44739.
97. Farooq, A., Plotnikova, O., Chaturvedi, G., Yan, S., Zeng, L., Zhang, Q., Zhou, M.M., *Solution structure of the MAPK phosphatase PAC-1 catalytic domain. Insights into substrate-induced enzymatic activation of MKP.* Structure, 2003. **11** (2): p. 155-164.
98. Zhou, B., Wu, L., Shen, K., Zhang, J., Lawrence, D.S., Zhang, Z.Y., *Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2.* J Biol Chem, 2001. **276** (9): p. 6506-6515.
99. Lin, Y.W., Yang, J.L., *Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling.* J Biol Chem, 2006. **281** (2): p. 915-926.
100. Ryser, S., Tortola, S., Schlegel, W., *Map kinase phosphatase-1 gene expression and regulation in neuroendocrine cells.* J Recept Signal Transduct Res, 2002. **22** (1-4): p. 17-29.
101. Metzler, B., Hu, Y., Sturm, G., Wick, G., Xu, Q., *Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by arachidonic acid in vascular smooth muscle cells.* J Biol Chem, 1998. **273** (50): p. 33320-33326.
102. Li, C., Hu, Y., Mayr, M., Xu, Q., *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, 1999. **274** (36): p. 25273-25280.
103. Schliess, F., Kurz, A.K., Haussinger, D., *Glucagon-induced expression of the MAP kinase phosphatase MKP-1 in rat hepatocytes.* Gastroenterology, 2000. **118** (5): p. 929-936.
104. Clark, A.R., *MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids?* J Endocrinol, 2003. **178** (1): p. 5-12.

105. Misra-Press, A., Rim, C.S., Yao, H., Roberson, M.S., Stork, P.J., *A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation.* J Biol Chem, 1995. **270** (24): p. 14587-14596.
106. Palm-Leis, A., Singh, U.S., Herbelin, B.S., Olsovsky, G.D., Baker, K.M., Pan, J., *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, 2004. **279** (52): p. 54905-54917.
107. Bey, P., Gorostizaga, A.B., Maloberti, P.M., Lozano, R.C., Poderoso, C., Maciel, F.C., Podesta, E.J., Paz, C., *Adrenocorticotropin induces mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 in Y1 mouse adrenocortical tumor cells.* Endocrinology, 2003. **144** (4): p. 1399-1406.
108. Brondello, J.M., Pouyssegur, J., McKenzie, F.R., *Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation.* Science, 1999. **286** (5449): p. 2514-2517.
109. Brondello, J.M., Brunet, A., Pouyssegur, J., McKenzie, F.R., *The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade.* J Biol Chem, 1997. **272** (2): p. 1368-1376.
110. Chen, P., Li, J., Barnes, J., Kokkonen, G.C., Lee, J.C., Liu, Y., *Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages.* J Immunol, 2002. **169** (11): p. 6408-6416.
111. Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., Arkinstall, S., *Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase.* Science, 1998. **280** (5367): p. 1262-1265.
112. Roberson, M.S., Bliss, S.P., Xie, J., Navratil, A.M., Farmerie, T.A., Wolfe, M.W., Clay, C.M., *Gonadotropin-releasing hormone induction of extracellular-signal regulated kinase is blocked by inhibition of calmodulin.* Mol Endocrinol, 2005. **19** (9): p. 2412-2423.
113. Choi, B.H., Hur, E.M., Lee, J.H., Jun, D.J., Kim, K.T., *Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death.* J Cell Sci, 2006. **119** (Pt 7): p. 1329-1340.
114. Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J.C., Touboul, T., Roux, D., Pouyssegur, J., Pages, G., *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, 2005. **25** (2): p. 854-864.
115. Cao, W., Bao, C., Padalko, E., Lowenstein, C.J., *Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling.* J Exp Med, 2008. **205** (6): p. 1491-1503.

116. Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R.J., Mandl, M., Keyse, S.M., *Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal.* J Biol Chem, 2004. **279** (40): p. 41882-41891.
117. Wishart, M.J., Dixon, J.E., *Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains.* Trends Biochem Sci, 1998. **23** (8): p. 301-306.
118. Sanchez-Perez, I., Martinez-Gomariz, M., Williams, D., Keyse, S.M., Perona, R., *CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin.* Oncogene, 2000. **19** (45): p. 5142-5152.
119. Small, G.W., Shi, Y.Y., Edmund, N.A., Somasundaram, S., Moore, D.T., Orlowski, R.Z., *Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role.* Mol Pharmacol, 2004. **66** (6): p. 1478-1490.
120. Franklin, C.C., Srikanth, S., Kraft, A.S., *Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95** (6): p. 3014-3019.
121. Wu, J.J., Bennett, A.M., *Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling.* J Biol Chem, 2005. **280** (16): p. 16461-16466.
122. Chi, H., Barry, S.P., Roth, R.J., Wu, J.J., Jones, E.A., Bennett, A.M., Flavell, R.A., *Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103** (7): p. 2274-2279.
123. Zhao, Q., Shepherd, E.G., Manson, M.E., Nelin, L.D., Sorokin, A., Liu, Y., *The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38.* J Biol Chem, 2005. **280** (9): p. 8101-8108.
124. Fawcett, D.W., *Gametogenesis in the male: prospects for its control.* Symp Soc Dev Biol, 1975 (33): p. 25-53.
125. Mooradian, A.D., Morley, J.E., Korenman, S.G., *Biological actions of androgens.* Endocr Rev, 1987. **8** (1): p. 1-28.
126. Scholer, D., Birkhauser, M., Peytremann, A., Riondel, A.M., Vallotton, M.B., Muller, A.F., *Response of plasma aldosterone to angiotensin II, ACTH and potassium in man.* Acta Endocrinol (Copenh), 1973. **72** (2): p. 293-307.
127. Fraser, R., Brown, J.J., Lever, A.F., Mason, P.A., Robertson, J.I., *Control of aldosterone secretion.* Clin Sci (Lond), 1979. **56** (5): p. 389-399.
128. Spat, A., Hunyady, L., *Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways.* Physiol Rev, 2004. **84** (2): p. 489-539.

-
129. Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A.N., Gravanis, A., *Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival*. Trends Endocrinol Metab, 2008. **19** (8): p. 300-307.
130. Dietschy, J.M., Turley, S.D., *Cholesterol metabolism in the brain*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12** (2): p. 105-112.
131. Steckelbroeck, S., Watzka, M., Stoffel-Wagner, B., Hans, V.H., Redel, L., Clusmann, H., Elger, C.E., Bidlingmaier, F., Klingmuller, D., *Expression of the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 mRNA in the human brain*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **171** (1-2): p. 165-168.
132. Kovanen, P.T., Goldstein, J.L., Chappell, D.A., Brown, M.S., *Regulation of low density lipoprotein receptors by adrenocorticotropin in the adrenal gland of mice and rats in vivo*. J Biol Chem, 1980. **255** (12): p. 5591-5598.
133. Gwynne, J.T., Mahaffee, D.D., *Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester*. J Biol Chem, 1989. **264** (14): p. 8141-8150.
134. Dorfman, R.I., *Biosynthesis of adrenocortical steroids*. Cancer, 1957. **10** (4): p. 741-745.
135. Simpson, E.R., Boyd, G.S., *The cholesterol side-chain cleavage system of the adrenal cortex: a mixed-function oxidase*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. **24** (1): p. 10-17.
136. Lambeth, J.D., Xu, X.X., Glover, M., *Cholesterol sulfate inhibits adrenal mitochondrial cholesterol side chain cleavage at a site distinct from cytochrome P-450_{scc}. Evidence for an intramitochondrial cholesterol translocator*. J Biol Chem, 1987. **262** (19): p. 9181-9188.
137. van der Vusse, G.J., Kalkman, M.L., van der Molen, H.J., *3Beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat testis tissue. Inter- and subcellular localization and inhibition by cyanoketone and nagarse*. Biochim Biophys Acta, 1974. **348** (3): p. 404-414.
138. Eipper, B.A., Mains, R.E., Guenzi, D., *High molecular weight forms of adrenocorticotropic hormone are glycoproteins*. J Biol Chem, 1976. **251** (13): p. 4121-4126.
139. Pierce, J.G., Parsons, T.F., *Glycoprotein hormones: structure and function*. Annu Rev Biochem, 1981. **50**: p. 465-495.
140. Podesta, E.J., Dufau, M.L., Solano, A.R., Catt, K.J., *Hormonal activation of protein kinase in isolated Leydig cells. Electrophoretic analysis of cyclic AMP receptors*. J Biol Chem, 1978. **253** (24): p. 8994-9001.
141. Rae, P.A., Gutmann, N.S., Tsao, J., Schimmer, B.P., *Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76** (4): p. 1896-1900.

142. Pon, L.A., Hartigan, J.A., Orme-Johnson, N.R., *Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein.* J Biol Chem, 1986. **261** (28): p. 13309-13316.
143. Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P.R., *Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought.* Mol Endocrinol, 2005. **19** (11): p. 2647-2659.
144. Ascoli, M., Fanelli, F., Segaloff, D.L., *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective.* Endocr Rev, 2002. **23** (2): p. 141-174.
145. Vilgrain, I., Defaye, G., Chambaz, E.M., *Adrenocortical cytochrome P-450 responsible for cholesterol side chain cleavage (P-450_{scc}) is phosphorylated by the calcium-activated, phospholipid-sensitive protein kinase (protein kinase C).* Biochem Biophys Res Commun, 1984. **125** (2): p. 554-561.
146. Carsia, R.V., Moyle, W.R., Wolff, D.J., Malamed, S., *Acute inhibition of corticosteroidogenesis by inhibitors of calmodulin action.* Endocrinology, 1982. **111** (5): p. 1456-1461.
147. Ascoli, M., *Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses.* Endocrinology, 1981. **108** (1): p. 88-95.
148. Hirakawa, T., Ascoli, M., *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, 2003. **17** (11): p. 2189-2200.
149. Manna, P.R., Jo, Y., Stocco, D.M., *Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling.* J Endocrinol, 2007. **193** (1): p. 53-63.
150. Schimmer, B.P., *Adrenocortical Y1 cells.* Methods Enzymol, 1979. **58**: p. 570-574.
151. Watanabe, G., Pena, P., Albanese, C., Wilsbacher, L.D., Young, J.B., Pestell, R.G., *Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo.* J Biol Chem, 1997. **272** (32): p. 20063-20069.
152. Le, T., Schimmer, B.P., *The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells.* Endocrinology, 2001. **142** (10): p. 4282-4287.
153. Simpson, E.R., Lund, J., Ahlgren, R., Waterman, M.R., *Regulation by cyclic AMP of the genes encoding steroidogenic enzymes: when the light finally shines.* Mol Cell Endocrinol, 1990. **70** (2): p. C25-28.
154. Koritz, S.B., Kumar, A.M., *On the mechanism of action of the adrenocorticotrophic hormone. The stimulation of the activity of enzymes involved in pregnenolone synthesis.* J Biol Chem, 1970. **245** (1): p. 152-159.

-
155. Karaboyas, G.C., Koritz, S.B., *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, 1965. **100**: p. 600-602.
 156. Jefcoate, C.R., DiBartolomeis, M.J., Williams, C.A., McNamara, B.C., *ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells*. J Steroid Biochem, 1987. **27** (4-6): p. 721-729.
 157. Tuckey, R.C., *Cholesterol side-chain cleavage by mitochondria from the human placenta. Studies using hydroxycholesterols as substrates*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **42** (8): p. 883-890.
 158. Garren, L.D., Ney, R.L., Davis, W.W., *Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by adrenocorticotrophic hormone in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **53** (6): p. 1443-1450.
 159. Arthur, J.R., Boyd, G.S., *The effect of inhibitors of protein synthesis on cholesterol side-chain cleavage in the mitochondria of luteinized rat ovaries*. Eur J Biochem, 1974. **49** (1): p. 117-127.
 160. Krueger, R.J., Orme-Johnson, N.R., *Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein*. J Biol Chem, 1983. **258** (16): p. 10159-10167.
 161. Papadopoulos, V., Amri, H., Li, H., Boujrad, N., Vidic, B., Garnier, M., *Targeted disruption of the peripheral-type benzodiazepine receptor gene inhibits steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line*. J Biol Chem, 1997. **272** (51): p. 32129-32135.
 162. Lacapere, J.J., Papadopoulos, V., *Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis*. Steroids, 2003. **68** (7-8): p. 569-585.
 163. Jefcoate, C., *High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex*. J Clin Invest, 2002. **110** (7): p. 881-890.
 164. Liu, J., Rone, M.B., Papadopoulos, V., *Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis*. J Biol Chem, 2006. **281** (50): p. 38879-38893.
 165. Papadopoulos, V., Liu, J., Culty, M., *Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import?* Mol Cell Endocrinol, 2007. **265-266**: p. 59-64.
 166. Anholt, R.R., De Souza, E.B., Oster-Granite, M.L., Snyder, S.H., *Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1985. **233** (2): p. 517-526.
 167. McEnery, M.W., Snowman, A.M., Trifiletti, R.R., Snyder, S.H., *Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion*

- channel and the adenine nucleotide carrier*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89** (8): p. 3170-3174.
168. Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T.R., Knudsen, T.B., Lacapere, J.J., Lindemann, P., Norenberg, M.D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.R., Gavish, M., *Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27** (8): p. 402-409.
169. Bovolín, P., Schlichting, J., Miyata, M., Ferrarese, C., Guidotti, A., Alho, H., *Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat*. Regul Pept, 1990. **29** (2-3): p. 267-281.
170. Papadopoulos, V., Brown, A.S., *Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **53** (1-6): p. 103-110.
171. Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., Stocco, D.M., *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, 1994. **269** (45): p. 28314-28322.
172. Artemenko, I.P., Zhao, D., Hales, D.B., Hales, K.H., Jefcoate, C.R., *Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells*. J Biol Chem, 2001. **276** (49): p. 46583-46596.
173. Clark, B.J., Stocco, D.M., *Steroidogenic acute regulatory protein: the StAR still shines brightly*. Mol Cell Endocrinol, 1997. **134** (1): p. 1-8.
174. Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., 3rd, Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A., Miller, W.L., *Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis*. Science, 1995. **267** (5205): p. 1828-1831.
175. Bose, H.S., Sugawara, T., Strauss, J.F., 3rd, Miller, W.L., *The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. International Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia Consortium*. N Engl J Med, 1996. **335** (25): p. 1870-1878.
176. Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., Parker, K.L., *Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94** (21): p. 11540-11545.
177. Stocco, D.M., Clark, B.J., Reinhart, A.J., Williams, S.C., Dyson, M., Dassi, B., Walsh, L.P., Manna, P.R., Wang, X.J., Zeleznik, A.J., Orly, J., *Elements involved in the regulation of the StAR gene*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **177** (1-2): p. 55-59.

-
178. Manna, P.R., Stocco, D.M., *Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression: functional and physiological consequences*. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2005. **5** (1): p. 93-108.
179. Clark, B.J., Soo, S.C., Caron, K.M., Ikeda, Y., Parker, K.L., Stocco, D.M., *Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein*. *Mol Endocrinol*, 1995. **9** (10): p. 1346-1355.
180. Clark, B.J., Combs, R., Hales, K.H., Hales, D.B., Stocco, D.M., *Inhibition of transcription affects synthesis of steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells*. *Endocrinology*, 1997. **138** (11): p. 4893-4901.
181. Stocco, D.M., *StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis*. *Annu Rev Physiol*, 2001. **63**: p. 193-213.
182. Reinhart, A.J., Williams, S.C., Stocco, D.M., *Transcriptional regulation of the StAR gene*. *Mol Cell Endocrinol*, 1999. **151** (1-2): p. 161-169.
183. Castilla, R., Gadaleta, M., Castillo, A.F., Duarte, A., Neuman, I., Paz, C., Cornejo Maciel, F., Podesta, E.J., *New enzymes involved in the mechanism of action of epidermal growth factor in a clonal strain of Leydig tumor cells*. *Endocrinology*, 2008. **149** (7): p. 3743-3752.
184. Manna, P.R., Chandrala, S.P., King, S.R., Jo, Y., Counis, R., Huhtaniemi, I.T., Stocco, D.M., *Molecular mechanisms of insulin-like growth factor-I mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse leydig cells*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20** (2): p. 362-378.
185. Cooke, B.A., Dirami, G., Chaudry, L., Choi, M.S., Abayasekara, D.R., Phipp, L., *Release of arachidonic acid and the effects of corticosteroids on steroidogenesis in rat testis Leydig cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1991. **40** (1-3): p. 465-471.
186. Mele, P.G., Dada, L.A., Paz, C., Neuman, I., Cymeryng, C.B., Mendez, C.F., Finkielstein, C.V., Cornejo Maciel, F., Podesta, E.J., *Involvement of arachidonic acid and the lipoxygenase pathway in mediating luteinizing hormone-induced testosterone synthesis in rat Leydig cells*. *Endocr Res*, 1997. **23** (1-2): p. 15-26.
187. Moraga, P.F., Llanos, M.N., Ronco, A.M., *Arachidonic acid release from rat Leydig cells depends on the presence of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin receptors*. *J Endocrinol*, 1997. **154** (2): p. 201-209.
188. Maloberti, P., Lozano, R.C., Mele, P.G., Cano, F., Colonna, C., Mendez, C.F., Paz, C., Podesta, E.J., *Concerted regulation of free arachidonic acid and hormone-induced steroid synthesis by acyl-CoA thioesterases and acyl-CoA synthetases in adrenal cells*. *Eur J Biochem*, 2002. **269** (22): p. 5599-5607.
189. Kang, M.J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., Iijima, H., Yamamoto, T.T., *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, 1997. **94** (7): p. 2880-2884.
190. Finkielstein, C., Maloberti, P., Mendez, C.F., Paz, C., Cornejo Maciel, F., Cymeryng, C., Neuman, I., Dada, L., Mele, P.G., Solano, A., Podesta, E.J., *An adrenocorticotropin-regulated phosphoprotein intermediary in steroid synthesis is similar to an acyl-CoA thioesterase enzyme*. Eur J Biochem, 1998. **256** (1): p. 60-66.
191. Paz, C., Dada, L.A., Cornejo Maciel, M.F., Mele, P.G., Cymeryng, C.B., Neuman, I., Mendez, C.F., Finkielstein, C.V., Solano, A.R., Park, M., et al., *Purification of a novel 43-kDa protein (p43) intermediary in the activation of steroidogenesis from rat adrenal gland*. Eur J Biochem, 1994. **224** (2): p. 709-716.
192. Maloberti, P., Castilla, R., Castillo, F., Maciel, F.C., Mendez, C.F., Paz, C., Podesta, E.J., *Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis*. FEBS J, 2005. **272** (7): p. 1804-1814.
193. Wang, X., Shen, C.L., Dyson, M.T., Yin, X., Schiffer, R.B., Grammas, P., Stocco, D.M., *The involvement of epoxygenase metabolites of arachidonic acid in cAMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression*. J Endocrinol, 2006. **190** (3): p. 871-878.
194. Castillo, A.F., Maciel, F.C., Castilla, R., Duarte, A., Maloberti, P., Paz, C., Podesta, E.J., *cAMP increases mitochondrial cholesterol transport through the induction of arachidonic acid release inside this organelle in Leydig cells*. FEBS J, 2006. **273** (22): p. 5011-5021.
195. Ariyoshi, N., Kim, Y.C., Artemenko, I., Bhattacharyya, K.K., Jefcoate, C.R., *Characterization of the rat Star gene that encodes the predominant 3.5-kilobase pair mRNA. ACTH stimulation of adrenal steroids in vivo precedes elevation of Star mRNA and protein*. J Biol Chem, 1998. **273** (13): p. 7610-7619.
196. Sugawara, T., Lin, D., Holt, J.A., Martin, K.O., Javitt, N.B., Miller, W.L., Strauss, J.F., 3rd, *Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity*. Biochemistry, 1995. **34** (39): p. 12506-12512.
197. Manna, P.R., Wang, X.J., Stocco, D.M., *Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression*. Steroids, 2003. **68** (14): p. 1125-1134.
198. Pescador, N., Soumano, K., Stocco, D.M., Price, C.A., Murphy, B.D., *Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea*. Biol Reprod, 1996. **55** (2): p. 485-491.
199. Zhao, D., Duan, H., Kim, Y.C., Jefcoate, C.R., *Rodent StAR mRNA is substantially regulated by control of mRNA stability through sites in the 3'-untranslated region and through coupling to ongoing transcription*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **96** (2): p. 155-173.

-
200. Hiroi, H., Christenson, L.K., Strauss, J.F., 3rd, *Regulation of transcription of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: temporal and spatial changes in transcription factor binding and histone modification*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **215** (1-2): p. 119-126.
201. Rusovici, R., Hui, Y.Y., Lavoie, H.A., *Epidermal growth factor-mediated inhibition of follicle-stimulating hormone-stimulated StAR gene expression in porcine granulosa cells is associated with reduced histone H3 acetylation*. Biol Reprod, 2005. **72** (4): p. 862-871.
202. Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K.L., *A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation*. Cell, 1994. **77** (4): p. 481-490.
203. Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., Milbrandt, J., *Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92** (24): p. 10939-10943.
204. Desclozeaux, M., Krylova, I.N., Horn, F., Fletterick, R.J., Ingraham, H.A., *Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1*. Mol Cell Biol, 2002. **22** (20): p. 7193-7203.
205. Hammer, G.D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B.D., Simpson, K., Weigel, N.L., Ingraham, H.A., *Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress*. Mol Cell, 1999. **3** (4): p. 521-526.
206. Jacob, A.L., Lund, J., Martinez, P., Hedin, L., *Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5*. J Biol Chem, 2001. **276** (40): p. 37659-37664.
207. Chen, W.Y., Lee, W.C., Hsu, N.C., Huang, F., Chung, B.C., *SUMO modification of repression domains modulates function of nuclear receptor 5A1 (steroidogenic factor-1)*. J Biol Chem, 2004. **279** (37): p. 38730-38735.
208. Havelock, J.C., Smith, A.L., Seely, J.B., Dooley, C.A., Rodgers, R.J., Rainey, W.E., Carr, B.R., *The NGFI-B family of transcription factors regulates expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the human ovary*. Mol Hum Reprod, 2005. **11** (2): p. 79-85.
209. Zhang, P., Mellon, S.H., *Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action*. Mol Endocrinol, 1997. **11** (7): p. 891-904.
210. Stocco, C.O., Lau, L.F., Gibori, G., *A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells*. J Biol Chem, 2002. **277** (5): p. 3293-3302.

-
211. Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J.A., Soria, B., Prentki, M., *Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1*. *Diabetes*, 1999. **48** (10): p. 2007-2014.
212. Martin, L.J., Tremblay, J.J., *The nuclear receptors NUR77 and SF1 play additive roles with c-JUN through distinct elements on the mouse Star promoter*. *J Mol Endocrinol*, 2009. **42** (2): p. 119-129.
213. Martin, L.J., Boucher, N., Brousseau, C., Tremblay, J.J., *The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I*. *Mol Endocrinol*, 2008. **22** (9): p. 2021-2037.
214. Davis, I.J., Lau, L.F., *Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14** (5): p. 3469-3483.
215. Song, K.H., Park, J.I., Lee, M.O., Soh, J., Lee, K., Choi, H.S., *LH induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression in testicular Leydig cells*. *Endocrinology*, 2001. **142** (12): p. 5116-5123.
216. Inaoka, Y., Yazawa, T., Uesaka, M., Mizutani, T., Yamada, K., Miyamoto, K., *Regulation of NGFI-B/Nur77 gene expression in the rat ovary and in leydig tumor cells MA-10*. *Mol Reprod Dev*, 2008. **75** (5): p. 931-939.
217. Kovalovsky, D., Refojo, D., Liberman, A.C., Hochbaum, D., Pereda, M.P., Coso, O.A., Stalla, G.K., Holsboer, F., Arzt, E., *Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways*. *Mol Endocrinol*, 2002. **16** (7): p. 1638-1651.
218. Gyles, S.L., Burns, C.J., Whitehouse, B.J., Sugden, D., Marsh, P.J., Persaud, S.J., Jones, P.M., *ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene*. *J Biol Chem*, 2001. **276** (37): p. 34888-34895.
219. Arakane, F., King, S.R., Du, Y., Kallen, C.B., Walsh, L.P., Watari, H., Stocco, D.M., Strauss, J.F., 3rd, *Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity*. *J Biol Chem*, 1997. **272** (51): p. 32656-32662.
220. Iyer, R.B., Chauhan, A., Koritz, S.B., *The stimulation by adrenocorticotropin of the phosphorylation of adrenal inhibitor-1: a possible role in steroidogenesis*. *Mol Cell Endocrinol*, 1988. **60** (1): p. 61-69.
221. Sayed, S.B., Whitehouse, B.J., Jones, P.M., *Phosphoserine/threonine phosphatases in the rat adrenal cortex: a role in the control of steroidogenesis?* *J Endocrinol*, 1997. **154** (3): p. 449-458.

-
222. Jones, P.M., Sayed, S.B., Persaud, S.J., Burns, C.J., Gyles, S., Whitehouse, B.J., *Cyclic AMP-induced expression of steroidogenic acute regulatory protein is dependent upon phosphoprotein phosphatase activities*. J Mol Endocrinol, 2000. **24** (2): p. 233-239.
223. Poderoso, C., Paz, C., Gorostizaga, A., Maciel, F.C., Mendez, C.F., Podesta, E.J., *Protein serine/threonine phosphatase 2A activity is inhibited by cAMP in MA-10 cells*. Endocr Res, 2002. **28** (4): p. 319-323.
224. Winnay, J.N., Hammer, G.D., *Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation*. Mol Endocrinol, 2006. **20** (1): p. 147-166.
225. Aesoy, R., Mellgren, G., Morohashi, K., Lund, J., *Activation of cAMP-dependent protein kinase increases the protein level of steroidogenic factor-1*. Endocrinology, 2002. **143** (1): p. 295-303.
226. Han, J.D., Rubin, C.S., *Regulation of cytoskeleton organization and paxillin dephosphorylation by cAMP. Studies on murine Y1 adrenal cells*. J Biol Chem, 1996. **271** (46): p. 29211-29215.
227. Vilgrain, I., Chinn, A., Gaillard, I., Chambaz, E.M., Feige, J.J., *Hormonal regulation of focal adhesions in bovine adrenocortical cells: induction of paxillin dephosphorylation by adrenocorticotrophic hormone*. Biochem J, 1998. **332** (Pt 2): p. 533-540.
228. Paz, C., Cornejo Maciel, F., Mendez, C., Podesta, E.J., *Corticotropin increases protein tyrosine phosphatase activity by a cAMP-dependent mechanism in rat adrenal gland*. Eur J Biochem, 1999. **265** (3): p. 911-918.
229. Paz, C., Cornejo Maciel, F., Maloberti, P., Walsh, L.P., Stocco, D.M., Podesta, E.J., *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, 2002. **175** (3): p. 793-801.
230. Gorostizaga, A., Cornejo Maciel, F., Brion, L., Maloberti, P., Podesta, E.J., Paz, C., *Tyrosine phosphatases in steroidogenic cells: regulation and function*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **265-266**: p. 131-137.
231. Sewer, M.B., Waterman, M.R., *CAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells*. J Biol Chem, 2003. **278** (10): p. 8106-8111.
232. Casal, A.J., Ryser, S., Capponi, A.M., Wang-Buholzer, C.F., *Angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression in bovine adrenal glomerulosa cells: implications in mineralocorticoid biosynthesis*. Endocrinology, 2007. **148** (11): p. 5573-5581.
233. Lorenz, S., Mattson, P., *Cinematic observations of cultured adrenocortical tumor cells. Dynamic responses to ACTH and cytochalasin B*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1986. **52** (3): p. 221-236.

-
234. Temple, R., Wolff, J., *Stimulation of steroid secretion by antimicrotubular agents*. J Biol Chem, 1973. **248** (8): p. 2691-2698.
235. Saltarelli, D., De la Llosa-Hermier, M.P., Tertrin-Clary, C., Hermier, C., *Effects of antimicrotubular agents in cAMP production and in steroidogenic response of isolated rat Leydig cells*. Biol Cell, 1984. **52** (3): p. 259-266.
236. Kotani, S., Murofushi, H., Sakai, H., *Dual effect of antimitotic drugs on steroid secretion in mouse adrenocortical Y-1 tumor cells*. Cell Struct Funct, 1988. **13** (2): p. 171-177.
237. Nagy, L., Freeman, D.A., *Effect of cholesterol transport inhibitors on steroidogenesis and plasma membrane cholesterol transport in cultured MA-10 Leydig tumor cells*. Endocrinology, 1990. **126** (5): p. 2267-2276.
238. Maciel, F.C., Poderoso, C., Gorostizaga, A., Paz, C., Podesta, E.J., *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, 2001. **170** (2): p. 403-411.
239. Cano, F., Poderoso, C., Cornejo Maciel, F., Castilla, R., Maloberti, P., Castillo, F., Neuman, I., Paz, C., Podesta, E.J., *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, 2006. **99** (4-5): p. 197-202.
240. Cornejo Maciel, F., Maloberti, P., Neuman, I., Cano, F., Castilla, R., Castillo, F., Paz, C., Podesta, E.J., *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, 2005. **34** (3): p. 655-666.
241. Sewer, M.B., Waterman, M.R., *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, 2002. **29** (1): p. 163-174.
242. Duan, H., Jefcoate, C.R., *The predominant cAMP-stimulated 3 x 5 kb StAR mRNA contains specific sequence elements in the extended 3'UTR that confer high basal instability*. J Mol Endocrinol, 2007. **38** (1-2): p. 159-179.
243. Chen, W.Y., Weng, J.H., Huang, C.C., Chung, B.C., *Histone deacetylase inhibitors reduce steroidogenesis through SCF-mediated ubiquitination and degradation of steroidogenic factor 1 (NR5A1)*. Mol Cell Biol, 2007. **27** (20): p. 7284-7290.
244. Robinson, F.L., Whitehurst, A.W., Raman, M., Cobb, M.H., *Identification of novel point mutations in ERK2 that selectively disrupt binding to MEK1*. J Biol Chem, 2002. **277** (17): p. 14844-14852.
245. Leibiger, B., Moede, T., Schwarz, T., Brown, G.R., Kohler, M., Leibiger, I.B., Berggren, P.O., *Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95** (16): p. 9307-9312.

-
246. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-254.
247. Stocco, D.M., *Rapid, quantitative isolation of mitochondria from rat liver using Ficoll gradients in vertical rotors*. Anal Biochem, 1983. **131** (2): p. 453-457.
248. Charles, C.H., Abler, A.S., Lau, L.F., *cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein*. Oncogene, 1992. **7** (1): p. 187-190.
249. Alonso, M., Melani, M., Converso, D., Jaitovich, A., Paz, C., Carreras, M.C., Medina, J.H., Poderoso, J.J., *Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development*. J Neurochem, 2004. **89** (1): p. 248-256.
250. Furst, R., Zahler, S., Vollmar, A.M., *Dexamethasone-induced expression of endothelial mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 involves activation of the transcription factors activator protein-1 and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein and the generation of reactive oxygen species*. Endocrinology, 2008. **149** (7): p. 3635-3642.
251. Toh, M.L., Yang, Y., Leech, M., Santos, L., Morand, E.F., *Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, a negative regulator of the mitogen-activated protein kinases, in rheumatoid arthritis: up-regulation by interleukin-1beta and glucocorticoids*. Arthritis Rheum, 2004. **50** (10): p. 3118-3128.
252. Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., Cato, A.C., *Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1*. EMBO J, 2001. **20** (24): p. 7108-7116.
253. Shiraishi, K., Ascoli, M., *A co-culture system reveals the involvement of intercellular pathways as mediators of the lutropin receptor (LHR)-stimulated ERK1/2 phosphorylation in Leydig cells*. Exp Cell Res, 2008. **314** (1): p. 25-37.
254. Liu, B., Shuai, K., *Regulation of the sumoylation system in gene expression*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20** (3): p. 288-293.
255. Sewer, M.B., Waterman, M.R., *Adrenocorticotropin/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcription of the human CYP17 gene in the adrenal cortex is dependent on phosphatase activity*. Endocrinology, 2002. **143** (5): p. 1769-1777.
256. Fuller, S.J., Davies, E.L., Gillespie-Brown, J., Sun, H., Tonks, N.K., *Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac myocytes*. Biochem J, 1997. **323** (Pt 2): p. 313-319.
257. Tajima, K., Dantes, A., Yao, Z., Sorokina, K., Kotsuji, F., Seger, R., Amsterdam, A., *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, 2003. **88** (5): p. 2288-2299.
258. Yu, R.N., Ito, M., Jameson, J.L., *The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element*. Mol Endocrinol, 1998. **12** (7): p. 1010-1022.
259. Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Ozato, K., Guroff, G., *Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B*. Nat Cell Biol, 2000. **2** (7): p. 435-440.