

Tesis Doctoral

MAP quinasa fosfatasa-2 (MKP-2): regulación hormonal y rol funcional en células de Leydig

Gómez, Natalia Valeria

2013

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:

Gómez, Natalia Valeria. (2013). MAP quinasa fosfatasa-2 (MKP-2): regulación hormonal y rol funcional en células de Leydig. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gómez, Natalia Valeria. "MAP quinasa fosfatasa-2 (MKP-2): regulación hormonal y rol funcional en células de Leydig". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**MAP quinasa fosfatasa-2 (MKP-2):
regulación hormonal y rol funcional en
células de Leydig**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de

Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciada Natalia Valeria Gómez

Directora de Tesis: Dra. Cristina del Valle Paz

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: INBIOMED, Departamento de Bioquímica Humana,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2013

MAP Quinasa Fosfatasa-2 (MKP-2): Regulación Hormonal y Rol Funcional en Células de Leydig

RESUMEN

La hormona luteinizante (LH) regula las funciones de las células de Leydig, principalmente la esteroidogénesis, a través de un mecanismo que incluye la activación de PKA y ERK1/2. Las MAPK fosfatasas (MKPs, **MAP Kinase Phosphatase**) desfosforilan específicamente a las MAPKs (**MAP Kinase**) y, consecuentemente, regulan procesos fisiológicos dependientes de MAPK. En este trabajo se demostró que, en células de Leydig MA-10, la activación del receptor de LH con gonadotropina coriónica humana (hCG) o el aumento de AMPc intracelular provocan la acumulación de MKP-2 y su translocación al núcleo. La acumulación es consecuencia de la activación transcripcional y de la estabilización de la proteína por modificaciones post-traduccionales. El bloqueo de la expresión de MKP-2 mediante un *shARN* – desarrollado en el marco de este trabajo– aumentó la fosforilación de ERK1/2 inducida por AMPc, particularmente a tiempos prolongados de estimulación. El bloqueo de la expresión de MKP-2 también aumentó la actividad del promotor y los niveles del ARNm correspondiente al gen CYP11A1, que codifica para una enzima esteroidogénica y se induce por LH/hCG vía ERK1/2. Se concluye que LH/hCG regula estrictamente la expresión de MKP-2 para controlar la fase terminal de actividad de ERK1/2 y “apagar” la expresión de genes inducidos por LH vía ERK1/2.

Palabras Clave: MKP-2, MAPKs, Esteroidogénesis, CYP11A1, ERK1/2

MAP Kinase Phosphatase-2 (MKP-2): Hormonal Regulation and Functional Role in Leydig Cells

ABSTRACT

The Luteinizing hormone (LH) regulates Leydig cell functions, mainly steroid synthesis, through a mechanism including PKA and ERK1/2 activation. MKPs (**MAP Kinase Phosphatases**) specifically dephosphorylate MAPKs (**MAP Kinases**) and, consequently, regulate MAPK-dependent physiological processes. The aim of this work was to analyze the regulation and function of MKP-2 in MA-10 Leydig cells. Results show that the increase in intracellular cAMP and the activation of the LH receptor with human Chorionic Gonadotropin promote MKP-2 accumulation and protein translocation to the nucleus. This accumulation results from gene transcription activation and post-translational modifications that increase protein stabilization. The specific down-regulation of MKP-2 by a shRNA –developed as part of this work– increased cAMP-induced ERK1/2 phosphorylation, particularly after prolonged stimulation. MKP-2 down-regulation by shRNA also increased both the promoter activity and mRNA levels of CYP11A1, which codifies for a steroidogenic enzyme induced by LH/hCG through an ERK-dependent mechanism. These findings demonstrate that LH/hCG tightly regulates MKP-2 expression to control the terminal phase of ERK1/2 activity and “turn off” the expression of LH/ERK-dependent genes

Key Words: MKP-2, MAPKs, Steroidogenesis, CYP11A1, ERK1/2

AGRADECIMIENTOS

- Muchas gracias Cristina por TODO. Por tu invaluable guía científica, por tus horas de trabajo, por tu paciencia, por tu comprensión (sobre todo en el último tiempo). Por ser tan buena persona conmigo siempre.
- Goros, Compañera! Siempre ahí para dar una mano con una sonrisa. Para acompañar en lo humano. Para alegrar el alma! Gracias, gracias, gracias.
- Andre, gracias por tu compañía. Por las mil charlas de música, películas y cosas que nos hacían volar la cabeza a otros mundos mejores cuando no dábamos más del embole de escribir y/o pipetear. Gracias por ayudarme a imprimir la tesis! Ah, (fundamental), gracias por todos los mates!
- Lau, estás allá leeeeejos ahora, pero cuando estuviste acá fuiste mi sostén en el laboratorio, mi maestra chiquitita. Y sos una amiga que quiero mucho.
- Mechi, “hermana científica”. Siempre a la par. Muchas gracias por ayudarme con tu orden, siempre supiste donde estaba todo!
- Ale Duarte, gracias por tu ayuda en el labo siempre. Por darme esa mano enorme cuando más la necesité. Por haber traído al mundo a esas dos personas hermosas que te acompañan. Como los quiero a esos dos!
- Fer, Ceci, Pau, Ro, las chicas de enfrente. Gracias por siempre estar para responder las mil dudas que me acechaban. Por ser tan buena onda. Por la alegría y el cariño. Fer gracias por tu orden, confiabilidad 100% y por tu cariño. Ceci, tus chistes! Ese buen humor que tenés y transmitís es lo mas! Pau, palabra “sagrada” en cuestiones científicas y un corazón hermoso. Ro, gracias por tu calidez, no por nada fuiste la primera a la que le conté mis cosas. Te acordás? Las tengo a todas en el corazón.
- Uli y Marian gracias a los dos por las mil charlas de ¿que hacemos? Fue importante para mi compartir con ustedes las decisiones que fui tomando. Uli, gracias por toda esa música!
- Isa, Fabiana, Pablo, Carlos muchas gracias por compartir conmigo su experiencia. Por su disponibilidad para dar una mano siempre. Isa, gracias por esa plantita hermosa que adornó mi balcón.
- A la Dra. Silvia Gonzalez-Calvar por la invaluable ayuda en muchos experimentos que hacen a esta tesis.
- Dr. Podestá, muchas gracias por permitirme ocupar ese espacio donde conocí a toda esta gente tan valiosa y donde pude crecer profesionalmente.

- Gracias a mis padres Marta y Pepe, que con mucho esfuerzo y amor siempre me acompañaron y apoyaron. Y me enseñaron a ser libre.
- Gracias a Claudia. Desde bebé que me acompañás con amor. Sos una guía.
- Gracias a Laura. Con mucho amor me mostraste cosas que terminaron siendo fundamentales en mi camino. Sos una guía.
- Gracias a mis tres sobrinos Lauti, Tade y Veri. Con esas sonrisas que tienen arreglan todos los problemas del mundo.
- Gracias a Julia, mi amiga muy querida. Todas las charlas que tengo con vos siempre me acomodan un poco. Sos muy valiosa, te quiero mucho siempre.
- Gracias a Daniel, mi amor. Te sumaste en la última parte de esta historia, pero tu amor es fundamental en cada paso que doy. Gracias por tu ayuda para seguir caminando con una sonrisa frente a toda dificultad.

ABREVIATURAS

22(R)OH colesterol: 22a-hidroxicolesterol

7TMS: Siete regiones transmembrana

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

AA: Acido araquidonico

Act D: Actinomicina D

Acot2. Acil-CoA tioesterasa mitocondrial

Acsl4: Acil-CoA sintetasa 4

ACTH: Adrenocorticotrofina u hormona adrenocorticotrofica

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AMPC: Adenosina 3', 5'-monofosfato ciclico

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albumina serica bovina

CHX: Cicloheximida

Cpm: Cuentas por minuto

CYP11A1: Complejo de escision de la cadena lateral del colesterol gene

dNTP: Deoxi-nucleotido trifosfato

DTT: Ditiotreitolo

DSPs: Fosfatasas de actividad dual

EDTA: Acido etilen diamino tetra-acetico

EGTA: Acido etilen glicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N' tetraacetico

ERK1/2: Extracellular-regulated kinase 1 y 2

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GDP: Guanosina difosfato

GTP: Guanosina trifosfato

H89: (N-[2-(p-bromocinamilamino)-etil]-5-isoquinolinasulfonamida)

hCG: Gonadotrofina corionica humana

JNKs o SAPKs: Quinasas del extremo N-terminal del factor de transcripcion cjun
o quinasas activadas por estres

LH: Hormona luteinizante

MAPKs: Proteina quinasas activadas por mitogenos

MAPKK: MAP quinasa quinasa

MAPKKK: MAP quinasa quinasa quinasa

MKPs: MAP quinasa fosfatasas

P4: Progesterona

P5: Pregnenolona

P450_{scc}: Complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol

PBS: Solución salina de fosfato

PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc

PKC: Proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos

PLC: Fosfolipasa C

PSTPs: serina/treonina fosfatasas

PTPs; Proteína tirosina fosfatasas "clásicas"

Raf: MAP quinasa quinasa quinasa (MEKK)

RIA: Radioinmunoanálisis

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein

STARD1: Steroidogenic Acute Regulatory Gene

TRIZOL: Fenol-isotiocianato de guanidina

TBS: Solución salina-Tris

TTBS: solución salina Tris-Tween

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

INDICE

INTRODUCCION

I. <u>MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES</u>	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. Proteína Tirosina Quinasas	6
I.4.2. Proteína Serina/Treonina Quinasas	7
I.4.2.a. Proteína Quinasa dependiente de AMPc	7
I.4.2.b. Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos	8
- <i>Clasificación</i>	8
- <i>Mecanismo de activación y regulación de la actividad de las MAPKs</i>	9
- <i>Sustratos de las MAPKs</i>	11
I.5. PROTEÍNAS FOSFATASAS	12
I.5.1. Proteínas Serina/Treonina Fosfatasa	12
I.5.2. Proteínas Tirosina Fosfatasa	13
I.5.2.a. Tirosina fosfatasa “clásicas” o PTPs	14
I.5.2.b. Proteínas Fosfatasa de Actividad Dual	16
- <i>Clasificación</i>	16
I.6. MAP QUINASAS FOSFATASAS	16
I.6.1. Clasificación de las MAP quinasas fosfatasa	16
I.6.2. Estructura de las MKPs	18
I.6.3. Mecanismo de acción	19
I.6.4. Regulación transcripcional y post-traducciona de las MKPs	22
I.6.5. Función biológica de las MKPs	24

<u>II- PARTICIPACIÓN DE MAPK EN LA ACCIÓN DE LAS</u>	
<u>HORMONAS LUTEINIZANTE Y ADRENOCORTICOTROFINA</u>	27
II.1. BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES	27
II.2. TEJIDOS PRODUCTORES DE HORMONAS ESTEROIDES	30
II.2.1. Testículo	30
II.2.2. Glándulas adrenales y ovario	31
II.2.3. Otros tejidos productores de esteroides	31
II.3. HORMONAS ESTEROIDOGÉNICAS Y SU MECANISMO DE ACCIÓN	32
II.3.1. Hormonas Esteroidogénicas	32
II.3.2. Mecanismo de acción de hormonas esteroidogénicas	33
<i>-Activación del receptor de LH</i>	33
<i>- Las MAPKs en el mecanismo de acción de hormonas esteroidogénicas</i>	34
II.4. REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESTEROIDOGÉNESIS	35
II.4.1. Proteínas que regulan la fase aguda de la esteroidogénesis	35
<i>- Proteína StAR</i>	37
<i>- Regulación hormonal de StAR</i>	38
<i>- Participación ERK1/2 en la regulación de StAR mediada por LH y ACTH</i>	38
II.4.2. Control de la expresión de enzimas esteroidogénicas por estimulación hormonal crónica	40
II.4.3. Control hormonal de la expresión de P450scc	40
<i>- Regulación transcripcional de CYP11A1</i>	41
II.4.4. Mediadores en la regulación hormonal de la transcripción del gen CYP11A1	42
<i>- Importancia de SF-1 en el control de la expresión de CYP11A1</i>	42
<i>- Otros factores de transcripción reguladores de la transcripción del gen CYP11A1</i>	43
<i>- Rol de ERK1/2 y JNK en la inducción de CYP11A1</i>	43

<u>III. PARTICIPACIÓN DE FOSFATASAS EN LA ACCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDOGÉNICAS</u>	45
III.1. REGULACIÓN POR LH/ACTH DE PROTEÍNAS FOSFATASAS	45
III.1.1. Regulación de Proteínas Serina/Treonina Fosfatasas por LH/ACTH	45
III.1.2. Regulación de Proteínas Tirosina Fosfatasas por LH/ACTH	46
III.1.3. Regulación de Proteínas Fosfatasas Duales por LH/ACTH	47
III.2. PAPEL FUNCIONAL DE LAS FOSFATASAS DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS PRODUCTORAS DE ESTEROIDES	49
III.2.1. Participación de PTPs en la regulación de la esteroidogénesis	49
III.2.2. Participación de MKP-1 en la regulación de la esteroidogénesis	51

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	54
-------------------------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

<u>I. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	55
I.1. REACTIVOS UTILIZADOS	55
I.2. PLÁSMIDOS UTILIZADOS	56
I.3. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	57
I.3.1. Electroforesis en geles de agarosa	57
I.3.2. Purificación de fragmentos de ADN	58
I.3.3. Ligación en el plásmido pGEM®-T Easy	58
I.3.4. Digestión con endonucleasas de restricción	58
I.3.5. Desfosforilación de vectores y reacción de ligación	59
I.4. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Y AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	59
1.4.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo de bacterias	59

I.4.2. Preparación de bacterias competentes	59
I.4.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i> competentes	60
I.4.4. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico en pequeña escala (MINIPREP)	60
I.4.5. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico en mediana escala (MIDIPREP)	61
I.5. LÍNEAS CELULARES	61
I.6. ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO	62
I.7. TRAMIENTO DE LAS CÉLULAS PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS	62
I.7.1. Obtención de lisados celulares	62
I.7.2. Fraccionamiento subcelular	62
I.8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	63
I.8.1. Determinación de proteínas por el método de Bradford	63
I.8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	63
I.8.3. Western blot	64
I.9. ANÁLISIS DEL ARN Y ADN	64
I.9.1. Extracción de ARN total	64
I.9.2. Transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	65
I.9.2.a. Reacción de transcripción reversa (RT)	65
I.9.2.b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	65
-Amplificación de ADNc de MKP-2 a partir de ADNc de ratón	65
-Amplificación de ADNc de MKP-2 a partir de MKP2- pGEM®-T Easy	66
-Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa (PCR semicuantitativa)	67
-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real-time PCR)	68

I.10. OBTENCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN <i>p3XFLAG-MKP-2</i>	69
I.11. OBTENCIÓN DE UN VECTOR DE EXPRESIÓN DE ARNs PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA DE MKP-2	70
I.12. MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA	72
I.13. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LAS LÍNEAS CELULARES	72
I.14. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA	73
I.15. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA	73
I.16. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)	74
I.17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74

RESULTADOS

<u>I. ANALISIS DE LA EXPRESION DE MKP-2 POR ACTIVACION DEL RECEPTOR DE LH EN CELULAS DE LEYDIG DE LA LINEA MA-10</u>	75
I.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MKP-2 POR hCG	75
I.2. INCREMENTO DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA MKP-2 MEDIADO POR hCG	80
I.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE MKP-2	81
<u>II. REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE MKP-2</u>	82
II.1. CONSTRUCCIÓN DE pFLAG-MKP-2	82
II.2. EXPRESIÓN DE pFLAG-MKP-2 EN CÉLULAS DE LEYDIG	83
<u>III. ROL FUNCIONAL DE MKP-2 EN LA REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESTEROIDOGENESIS</u>	98
III.1. CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO PARA GENERAR UN ARN DE INTERFERENCIA Y BLOQUEAR LA EXPRESIÓN DE MKP-2	98
III.2. EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN O INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MKP-2 SOBRE EL GRADO DE FOSFORILACIÓN DE ERK1/2	101

III.3. EFECTO DE MKP-2 SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN CYP11A1	103
III.4. EFECTO DE MKP-2 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA EN CÉLULAS DE LEYDIG DE LA LÍNEA MA-10	107

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

<u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	111
<i>CONCLUSIONES FINALES</i>	124

BIBLIOGRAFÍA

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	126
----------------------------	-----

INTRODUCCIÓN

I. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

I.1. GENERALIDADES

La necesidad de los seres vivos de adaptarse a los constantes cambios en el medio ambiente ha llevado al desarrollo de sistemas apropiados para censar la información del medio ambiente y responder apropiadamente a los cambios de éste. Debido a la variabilidad de estímulos que brinda el entorno, los organismos tienen que ser capaces de elaborar respuestas altamente específicas en el marco temporal apropiado para asegurar la homeostasis. Los estímulos del entorno celular que impactan en la actividad celular y que se consideran señales extracelulares pueden ser físicos o químicos. La temperatura, presión osmótica, luminosidad, entre otras, son señales físicas captadas constantemente por los organismos vivos. En respuesta a esos estímulos los organismos elaboran una respuesta apropiada para adaptarse a los cambios correspondientes. Por ejemplo 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), las que a través de diferentes mecanismos ejercen un efecto protector frente a esta condición adversa (1). En el mismo contexto, el estrés osmótico -una condición que es sensada en particular por ciertos tipos celulares ante un cambio en la osmolaridad del medio- provoca cambios adaptativos profundos que se asocian a una alteración en la expresión de genes (2).

Existen también diversas señales extracelulares de origen químico que impactan en los organismos vivos generando una respuesta específica. Podemos mencionar como ejemplo moléculas de naturaleza muy diversa tales como proteínas, péptidos, aminoácidos, esteroides, derivados de ácidos grasos y hasta gases disueltos. Las hormonas luteinizante (LH) y adrenocorticotrofina (ACTH) son dos ejemplos de proteínas o péptidos con la capacidad de regular funciones celulares específicas, en este caso 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 extracelulares (5).

El conjunto de procesos por los cuales una señal extracelular es transformada en una señal específica intracelular se conoce como mecanismo de transducción de señales. Este mecanismo permite que moléculas que por su tamaño u otra condición no pueden ingresar a una célula, aún puedan ser “detectadas” por éstas y provocar una respuesta. El mismo involucra al menos tres pasos: en primer lugar, la captación de las señales externas en la superficie celular mediante moléculas presentes en la

membrana altamente específicas para cada estímulo. 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.

Dado que la variedad de señales físicas y químicas a las cuales las células responden es sumamente amplia, podría esperarse una magnitud similar en el número de posibles caminos de transducción de señales. Sin embargo, existe sólo una serie limitada de cascadas de señalización capaces de generar una respuesta apropiada para cada estímulo en diferentes tipos celulares. La capacidad de las células de exhibir especificidad en la respuesta, a pesar del escaso número de vías de transducción de señales, se debe a la presencia de diferentes tipos de moléculas receptoras para cada señal química.

La maquinaria de señalización está conformada por proteínas con diversas funciones. Dos grupos importantes de éstas son las enzimas con actividad de proteína quinasa y de proteína fosfatasa. Las quinasas catalizan la unión, mediante un enlace fosfo-éster, de un grupo fosfato al grupo hidroxilo de los aminoácidos Serina o Treonina (serina/treonina quinasas) o Tirosina (tirosina quinasas). Las enzimas con actividad de proteína fosfatasa hidrolizan la unión ester fosfórico presente en las fosfoproteínas. Dado que estas enzimas pueden cambiar el estado de fosforilación de las proteínas celulares, los estímulos que impactan en este tipo de enzimas pueden provocar cambios en la actividad de aquellas proteínas que son sus sustratos. Más aún, dado que la actividad transcripcional de ciertos factores puede ser modulada por cambios en el estado de fosforilación de los mismos, los estímulos externos que producen cambios en la actividad de quinasas y/o fosfatasas pueden promover incluso cambios en la actividad génica. Además, cada tipo celular presenta maquinarias efectoras específicas, de tal forma que las señales generadas en la cascada de transducción de señales de dos o más estímulos, aún siendo idénticos, pueden activar una respuesta distinta en cada tipo celular.

Las respuestas desencadenadas por las señales extracelulares incluyen, además de cambios en la expresión génica como ya se mencionó, cambios en la actividad de vías metabólicas, en la locomoción celular, en la tasa de proliferación y muerte celular, entre otros. Estos cambios involucran la regulación de la actividad de enzimas y/o de la expresión de proteínas específicas, entre otros procesos celulares. La regulación de la expresión génica provoca cambios en los niveles de diferentes proteínas, desde proteínas reguladoras de la actividad metabólica hasta factores de transcripción, que a su vez pueden regular la expresión de aún más genes. Por lo tanto, un estímulo inicial puede regular, 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 LH y la transducción de señales que ésta desencadena, por lo cual en esta introducción se describirán algunas moléculas involucradas en los mecanismos de transducción de señales de hormonas en general, pero con particular énfasis en aquellas que participan en la acción de LH.

I.2. RECEPTORES HORMONALES

Las células que responden a una dada hormona poseen moléculas capaces de reconocer y unir a las mismas con alta afinidad y especificidad. A estas moléculas se las denomina receptores. Un grupo importante de hormonas son de naturaleza liposoluble 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. Generalmente estas hormonas 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 mencionó 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, además de los receptores, la participación de otras moléculas altamente específicas cuya acción coordinada constituye lo que denominamos mecanismo de transducción de señales. En cuanto a su estructura, todos los receptores de membrana tienen al menos un dominio extracelular donde se localiza el sitio de unión al ligando y al menos 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. La información transmitida por el ligando, llamado mensajero primario, debe ser traducida en otra forma que altere la bioquímica de la célula.

La unión de un tipo de hormonas a su receptor promueve la actividad de tirosina quinasa que estos poseen, es por esto que a este tipo de receptores se los denomina receptores tirosina quinasa o RTKs (**Receptor Tyrosine Kinases**) (7, 8). La unión de los RTKs a sus ligandos desencadena la autofosforilación de los receptores en residuos de Tirosina y dicha modificación promueve su capacidad 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 su extremo amino en el espacio extracelular y su extremo carboxilo en el espacio citoplasmático (10) y se encuentran asociados a un tipo particular de proteínas denominadas proteínas G (el tema de las proteínas G se desarrolla con mayor profundidad en la sección I-3).

Ambos tipos de receptores, RTKs y 7TMS, 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, los ligandos que se unen a receptores de membrana del tipo 7TMS utilizan pequeñas moléculas, llamadas segundos mensajeros, para transducir la información al interior de la célula haciendo posible el efecto biológico.

I.3. PROTEÍNAS G Y 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 (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). La modulación de la actividad de diferentes proteínas (enzimas, canales iónicos) como resultado de la activación de proteínas G 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. El AMP cíclico (AMPc) por ejemplo es un segundo mensajero. La isoforma $G\alpha_s$ estimula a la adenilil ciclasa y lleva al incremento de AMPc mientras que $G\alpha_i$ inhibe a la adenilil ciclasa y por lo tanto disminuye los niveles de AMPc.

Los miembros de la familia $G\alpha_q$ se unen y activan a la fosfolipasa C (PLC), que cataliza el clivaje del fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) para generar los mensajeros

diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) (11). El IP3 es un mensajero soluble que se une a receptores específicos en la membrana del retículo endoplásmico provocando la salida de Ca^{2+} de esa organela, ion que también actúa como segundo mensajero.

Para la subunidad α se han caracterizado al menos 23 isoformas que han sido agrupadas en cuatro familias: α_s , α_i , α_q , α_{12} . Por otro lado, para la subunidad β se han descrito 7 isoformas y para la subunidad γ , 12 isoformas (13). En contraste, la información con respecto a las subunidades β y γ es más limitada. Sin embargo, actualmente se conoce que éstos tienen también un rol importante en la señalización intracelular. Estas subunidades funcionan como dímeros para activar moléculas de señalización como fosfolipasas, canales iónicos y quinasas de lípidos (11). Además de la regulación de estos clásicos sistemas de generación de segundos mensajeros, tanto el dímero $\beta\gamma$ como la subunidad α (α_{12} y α_q) pueden controlar la actividad de moléculas clave para la transducción de señales intracelulares, incluyendo las pequeñas proteínas de unión a GTP de las familias de Ras y Rho y miembros de las quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPKs) a través de una intrincada red de señalización que todavía no está completamente dilucidada (14).

La generación de segundos mensajeros tales como el AMPc, IP3, DAG, Ca^{2+} y GMPc, convergen en la activación de quinasas y en la consecuente fosforilación de proteínas. Incluso estos segundos mensajeros, a través de su acción sobre las quinasas, pueden llevar a la fosforilación de proteínas con actividad de fosfatasas y modular la actividad de éstas, promoviendo así la desfosforilación de proteínas. La fosforilación de proteínas es una modificación covalente que puede cambiar las propiedades estructurales de las proteínas y, en la mayoría de los casos, este cambio está asociado a la modulación de su actividad biológica. El resultado de la activación de quinasas o fosfatasas es una alteración en la actividad celular, que incluso puede involucrar un cambio en la expresión de genes. Es importante destacar que 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 de proteínas fosfatasas. Por lo tanto ambos tipos de enzimas, quinasas y fosfatasas, son igualmente importantes para la señalización intracelular. A continuación se describirán aspectos relacionados con estos dos tipos de moléculas: proteínas quinasas y proteínas fosfatasas.

I.4. PROTEÍNAS QUINASAS

La fosforilación de proteínas en residuos de Serina, Treonina o Tirosina es 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: proteína tirosina quinasas o proteína serina/treonina quinasas.

I.4.1. Proteína Tirosina Quinasas

Este grupo de quinasas incluye, entre otras, a las quinasas JAKs (*Janus Tyrosine Kinases*). Estas se encuentran asociadas a receptores de tipo tirosina quinasa y su actividad se requiere para la fosforilación de las proteínas STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (15). Otro grupo de tirosina quinasas es el conformado por las quinasas de la familia de tirosina quinasas homologas a la proteína PP60 del virus de sarcoma Rous, o quinasas SRC, cuyos sustratos son fundamentalmente proteínas del citoesqueleto o moléculas de adhesión (16). El tercer grupo, y más ampliamente caracterizado, es el conformado por los receptores de membrana con actividad de tirosina quinasas o RTKs ya mencionado. Estos receptores son los mediadores de la acción de diversos factores de crecimiento como EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factors*), NGF (*Nerve Growth Factor*), e insulina, entre otros (17). Por ejemplo el receptor de insulina está constituido por dos subunidades α , unidas entre sí por puentes disulfuro, y dos subunidades β . Las subunidades β están unidas a las α también por un puente disulfuro. Las subunidades α se encuentran en el lado extracelular de la membrana y son las que toman contacto con la insulina. Las unidades β son las que poseen la actividad quinasa.

En líneas generales, el funcionamiento de los receptores RTKs es el siguiente. La unión del ligando a su RTK produce 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*). 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). Las moléculas blanco, al ser fosforiladas, pueden reconocer y unir otras proteínas con dominios SH2, de modo que el receptor activado recluta diferentes moléculas y por medio de sucesivas interacciones contribuye a la transmisión de la señal.

I.4.2. Proteína 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 que luego es capaz de fosforilar en serina/treonina a diversos sustratos, entre ellos las proteínas Smads (22). 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. Este grupo de quinasas son activadas por diversos estímulos, como hormonas, daño al ADN, estrés oxidativo, radiación UV. Excepto las MAPKs, las demás quinasas de este grupo se activan a través de mensajeros, tales como AMPc, GMPc, DAG, y Ca^{2+} /calmodulina, entre otros.

A continuación se describirán características bioquímicas de PKA y las MAPKs, que son las quinasas más relevantes en el contexto de este trabajo de Tesis.

I.4.2.a. Proteína Quinasa dependiente de AMPc

La proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA constituye un mediador central en la señalización intracelular dada 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). Se ha descrito un rol esencial de PKA en la proliferación y migración en distintas células tumorales (26, 27), así como también en la plasticidad neuronal y en la consolidación de la memoria (28, 29).

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) (30). Estas subunidades se expresan diferencialmente en los distintos tejidos y son capaces de integrar distintas isoformas de PKA (30). 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. El sitio consenso de fosforilación para PKA está ampliamente descrito y es Lys/Arg-Lys/Arg-Lys/Arg-Asn/Arg-pSer-pThr-Phe/Ile/Leu/Val/Tyr-Ile-Phe-Asp. 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 (31). 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 (32).

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 (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPKs) constituyen una familia de serina/treonina quinasas que desempeñan un papel fundamental en la regulación de una amplia variedad de funciones celulares, como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Estas quinasas se clasifican en tres grandes subgrupos, 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 (33). En humanos se expresan una decena de miembros de estas subfamilias, entre ellos ERK1, ERK2, ERK3, ERK5 y ERK7; JNK1, JNK2, JNK3 y las proteínas p38 MAPKs (33-35). ERK1 y ERK2 exhiben una alta homología de secuencia, especialmente en el dominio de unión al sustrato (36), tienen un peso molecular de 44 y 42 kDa respectivamente, se expresan de manera ubicua y se activan principalmente en respuesta a factores de crecimiento y estímulos proliferativos (35, 37).

El grupo de las JNKs se activa en respuesta a múltiples formas de estrés ambiental y a citoquinas (38). 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 (39).

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 (40), a distintos tipos de estrés ambiental (41), endotoxinas (42), hiperosmolaridad (43), 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 (35). El sitio de fosforilación, ubicado en el dominio quinasa, consiste en un tripéptido con una secuencia general Treonina-X-Tirosina. Los diferentes grupos de MAPKs están definidos por la identidad del aminoácido x que separa a los residuos de treonina y tirosina fosforilados, siendo el motivo de fosforilación dual thr-**glu**-tyr, thr-**gly**-tyr y thr-**pro**-tyr para los tres grupos de MAPKs: ERKs, p38 y JNKs respectivamente (33, 34, 44). 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 fosforilaciones que conducen 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; las isoformas 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 promueven la activación de las ERKs vía MEK1 y MEK2. Una proteína que une GTP denominada Ras se activa, vía RTKs y receptores 7TMS, y lleva a la activación de Raf (45). El grupo de JNKs, al igual que el de p38, es activado por varias MAPKKs, incluyendo el grupo de las MEK quinasas (MEKK) (33, 44) (Figura 1).

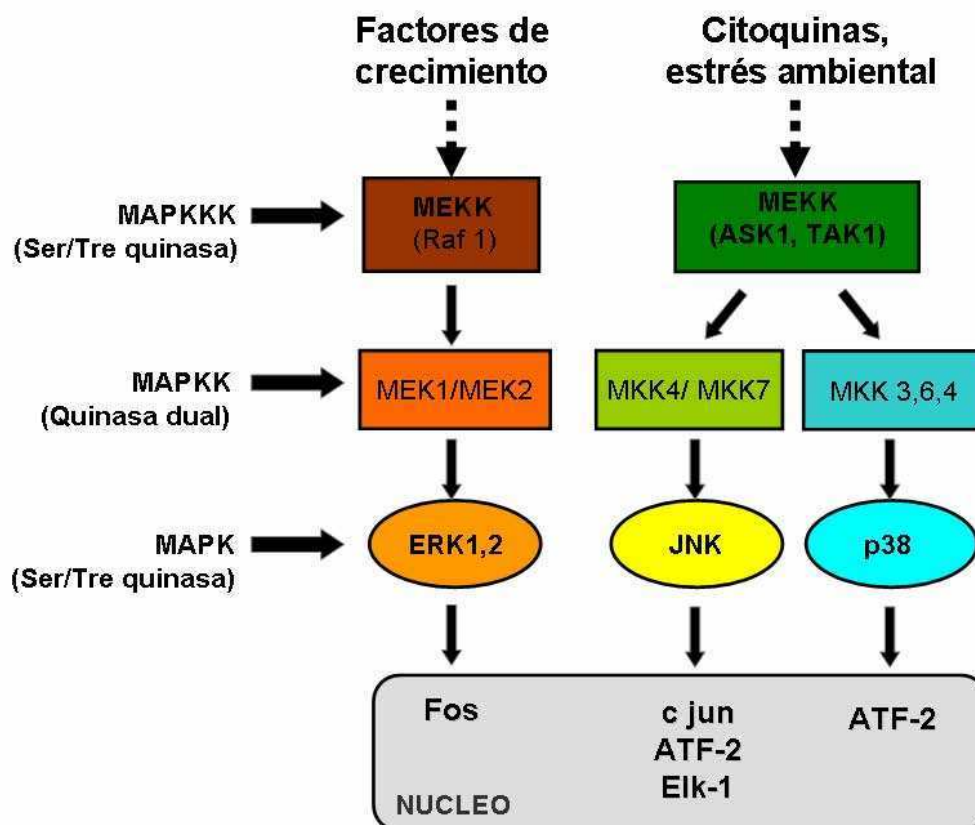


Figura 1. Esquema de las cascadas de activación de los tres principales grupos de MAP quinasas, ERKs, JNKs y p38. La activación de las MAPKs incluye la fosforilación y activación secuencial de distintas proteínas por acción de diferentes quinasas específicas: las MAP quinasa quinasa (MAPKKK) y las MAP quinasa quinasa (MAPKK). Diferentes estímulos desencadenan la activación del primer miembro de la cascada, las MAPKKK, y lleva a la activación de las MAPKs como ERKs, JNKs y p38. Estas pueden fosforilar diferentes proteínas, incluidos los factores de transcripción como Fos, cJun, Elk-1, y controlar la actividad celular.

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. Esta organización favorece la activación de una vía de señalización específica frente a un estímulo determinado.

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 la activación de ERK (46, 47). De manera similar la proteína MP1 promueve la asociación de ERK a MEK (48). 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 (49). Para el grupo de las JNKs también se conocen proteínas adaptadoras como las proteínas JIPs (*JNK Interacting Proteins*) y Axin, que promueven la asociación de JNK con su quinasa activadora MKK7 (35). OSM (*Osmosensing Scaffold for MEKK3*) es una de las pocas proteínas adaptadoras descritas para el grupo de las MAPKs p38, sin embargo se ha demostrado que algunos miembros de la familia de las JIPs se asocian también a las isoformas de p38 (50, 51).

El control de la magnitud y duración de la actividad de las MAPKs, y por consiguiente el resultado de la señalización, depende no sólo de las quinasas que actúan corriente arriba para activarlas sino también de proteínas fosfatasas que las inactivan. El estado de fosforilación de las MAPK, y por lo tanto el grado de actividad de las mismas, resulta del balance entre la actividad de quinasas y fosfatasas. La desfosforilación de los aminoácidos Treonina y Tirosina del dominio catalítico de las MAPKs (motivo thr-x-tyr) resulta en la inhibición de su actividad enzimática. En próximas secciones nos referiremos a las fosfatasas de proteínas involucradas en el proceso de inactivación de las MAPKs.

- Sustratos de las MAPKs

Los miembros de cada subgrupo de las MAPKs 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 quinasas también fosforilan enzimas citoplasmáticas como ciertas fosfolipasas, proteínas del citoesqueleto y proteínas de membrana como calnexina (33). Más aún, se ha descrito la fosforilación mediada por ERK1/2 en la mitocondria de una proteína esencial para la estimulación hormonal de la esteroidogénesis, la proteína StAR (52).

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 (33).

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: las 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.

Las proteínas fosfatasas pueden ser clasificadas en dos grupos, dependiendo del residuo fosforilado sobre el que actúan: serina/treonina fosfatasas (53) y tirosina fosfatasas (54). Las fosfatasas de especificidad dual (Serina/Treonina y Tirosina) se las suele incluir en el grupo de tirosina fosfatasas (55). Describiremos a continuación los aspectos más relevantes referidos a las enzimas de estos grupos, particularmente los aspectos referidos a un subgrupo de fosfatasas de actividad dual: las fosfatasas que actúan sobre las MAPKs.

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 PPs 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).

La fosforilación, tanto en serina/treonina como en tirosina, constituye uno de los mecanismos involucrados en la regulación de PPs. La modulación de la actividad de las PPs por fosforilación en residuos de tirosina lleva a un *cross-talk* entre las vías de señalización que ocurren con modificaciones en residuos de tirosina y de serina/treonina. 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 RTKs (66, 67). En todos los casos, la fosforilación en tirosina produce la inactivación de PP2A. Esto indica que la activación de tirosina quinasas, que va acompañada de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, conduce a la inhibición de la actividad de serina/treonina fosfatasa de PP2A. Por lo tanto, la activación de tirosina quinasas también conduce a un aumento en el nivel de proteínas fosforiladas en residuos de serina/treonina.

La metilación es otro mecanismo relevante para la regulación de las PPs. Una carboxi-metiltransferasa específica metila a PP2A y esta modificación puede ser revertida en la célula intacta debido a la presencia de una metiltransferasa 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. Proteína 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). Las enzimas que desfosforilan únicamente residuos de tirosina se las denomina PTPs "clásicas" (*Protein Tyrosine Phosphatase*). Se han identificado hasta la fecha 107 genes humanos que codifican para este tipo de tirosina

fosfatasa (72). En la última década ha cobrado énfasis el estudio de las mismas y su rol en la transducción de señales, aunque la información aún es limitada o al menos no comparable a la alcanzada con respecto a las tirosina quinasas.

Al grupo de enzimas que exhiben actividad dual, ya que desfosforilan tanto residuos de Serina/Treonina como de Tirosina, se las denomina proteínas fosfatasa de actividad dual (*Dual Specificity Phosphatases*, DSPs) (73, 74). Aunque las PTPs y las DSP 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. Tirosina fosfatasa “clásicas” o PTPs

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

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.

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 (75, 76).

La fosforilación en tirosina modula la actividad de PTPs. Por ejemplo, la insulina a través de la activación de su receptor fosforila a dos fosfatasa citosólicas: PTP1B (77) y PTP1C (78), incrementando así su actividad. La activación de estas PTPs por fosforilación permite regular negativamente la acción de la insulina (79, 80). 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 (81, 82).

Otra PTP que se regula por fosforilación es PTP1D. En este caso se ha documentado la fosforilación tanto en residuos de Serina/Treonina como de Tirosina (83, 84). En células adrenocorticales de rata PTP1D se activa por fosforilación dependiente de PKA en respuesta al estímulo hormonal (85).

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 fosfatasas de actividad dual constituyen un grupo heterogéneo de fosfatasas que remueven el grupo fosfato unido tanto a Tirosina como a Serina y Treonina. Este grupo de fosfatasas puede dividirse en varios sub-grupos, como los conformados por las enzimas PRLs (**Phosphatases of Regenerating Liver**), Cdc14 fosfatasas (**cell division cycle**), MKPs (**MAP Kinase Phosphatases**) y DSPs “atípicas”, entre otros.

El grupo de las MKPs es el grupo más grande de proteínas fosfatasas dedicadas a la regulación específica de la actividad de las MAPK en células de mamífero (88). En el contexto de este trabajo, este es el grupo de fosfatasas que nos interesan particularmente.

I.6. MAP QUINASA FOSFATASAS

I.6.1. Clasificación de las MAP quinasa fosfatasas

Las MKPs desfosforilan específicamente a las MAPK en los aminoácidos Treonina y Tirosina del sitio regulatorio. En mamíferos, existen más de 10 miembros de la familia de las MKPs que desfosforilan MAPKs con una eficiencia variable (Figura 2).

Como hemos analizado en la sección anterior, las MAPKs son componentes de diversos caminos de señalización que actúan de manera concertada para determinar respuestas tanto fisiológicas como patológicas a una amplia variedad de estímulos extra e intra celulares. La duración y magnitud de la activación de las MAPK es regulada en varios puntos dentro de un camino de señalización. La actividad de las MAPK refleja un balance entre las actividades de las quinasas que promueven su activación y de fosfatasas que las inactivan. Dado que la fosforilación de los residuos de Treonina y Tirosina son requeridos para la actividad de las MAPK, la defosforilación de estos es suficiente para su inactivación. Aquí reside la mayor y más clásica razón por la que las fosfatasas han sido estudiadas, por su rol como reguladores de la actividad de las MAPK.

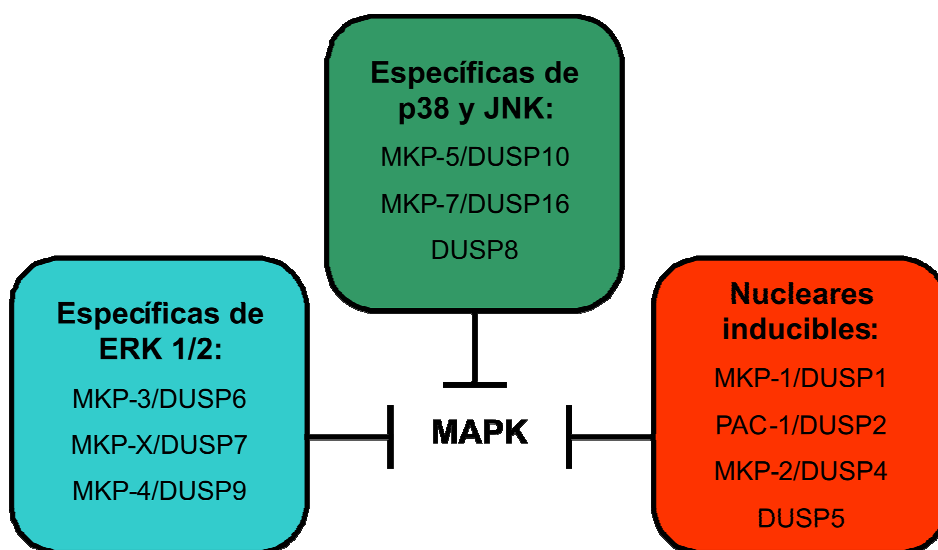


Figura 2. Familia de las MAP Quinasas Fosfatasa (MKPs) El esquema muestra los diferentes miembros de la familia de las MKPs, agrupados según la especificidad de sustrato y localización subcelular (89).

La caracterización actual de los miembros de la familia de las MKPs se basa en la homología de secuencia, estructura proteica, especificidad de sustrato y localización subcelular. Se las clasifica en tres grandes grupos: el primero, comprende enzimas nucleares rápidamente inducibles por factores de crecimiento o señales de estrés (89-91). En este grupo están incluidas MKP-1, MKP-2, PAC-1 y hVH3. Estas enzimas están conformadas por 300 a 400 aminoácidos y no presentan secuencias de localización nuclear clásicas.

El segundo subgrupo de MKPs, tipificado por MKP-3, incluye enzimas citosólicas predominantemente, debido a que presentan secuencias de exportación nuclear (**Nuclear Export Sequence, NES**), y cuyos transcritos 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 de mayor peso molecular 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).

I.6.2. Estructura de las MKPs

Las MKPs tienen un peso molecular que varía entre 34 y 69 kDa y presentan una estructura general con dos dominios bien caracterizados. En el extremo C-terminal presentan el dominio catalítico con actividad de fosfatasa dual, mientras que en la proci3n N-terminal contienen el sitio de un3n al sustrato o motivo MKB (**M**ap **K**inase **B**inding), tambi3n llamado motivo KIM (**K**inase **I**nteracting **M**otif) (Figura 3).

En el dominio catal3tico existe una homolog3a mayor al 80% entre los distintos miembros de la familia de las MKPs. Este dominio est3 constituido por aproximadamente 140 amino3cidos y posee una secuencia de 9 amino3cidos (his-cys-x-x-gly-x-x-arg-ser) que est3 involucrada espec3ficamente en la cat3lisis. El residuo de cisteina de esta secuencia est3 ubicado en la base de la hendidura catal3tica, mientras que el residuo de arginina se repliega hacia el sitio MKB para ayudar en la cat3lisis (55, 73).

El dominio MKB de las MKPs contiene un grupo de amino3cidos cargados positivamente, inclusi3dos dentro de una regi3n hidrof3bica, responsables de la interacci3n con las MAPKs (95, 96). Debido a que el dominio catal3tico no muestra selectividad estricta hacia los miembros de la familia de las MAPKs, el dominio MKB juega un rol fundamental en la regulaci3n de la especificidad de sustrato de las MKPs, ya que 3stas utilizar3n como sustrato a la MAPK unida a este dominio. M3s a3n, se ha demostrado que varias MKPs son activadas por la un3n al sustrato a trav3s de su dominio MKB (97, 98). Por ejemplo el dominio catal3tico de MKP-3 experimenta un cambio conformacional cuando 3sta se une, a trav3s del dominio MKB, a la MAPK fosforilada. Este cambio conformacional causa un incremento en la actividad catal3tica de MKP-3 (99).

Las MKPs nucleares presentan un motivo leu-x-x-leu-leu (o motivo LXXLL) en el extremo N-terminal, el cual media la asociaci3n con receptores nucleares y por lo tanto, facilita el transporte de las mismas al n3cleo (100, 101). En MKP-2 adem3s se han descrito dos motivos que comprenden secuencias aminoac3dicas cortas y b3sicas con alto contenido de Arginina y Lisina que son necesarias para la localizaci3n nuclear de esta fosfatasa, ya que mutaciones en estas secuencias determinan la exclusi3n del n3cleo. Estas secuencias se denominan NLS1 y NLS2 (**N**uclear **L**ocalization **S**equences) (102) (Figura 3).

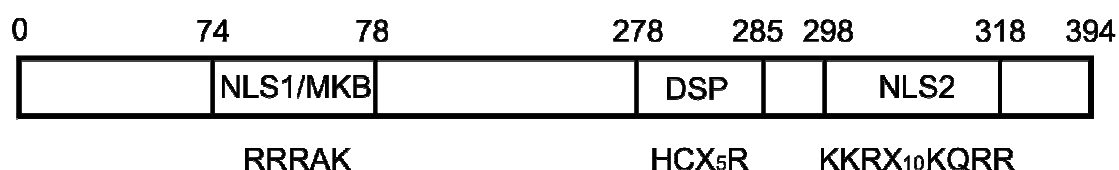


Figura 3. Dominios estructurales de la proteína MKP-2. Los fragmentos señalados corresponden a los dominios estructurales principales de MKP-2, incluyendo los dos NLS (*Nuclear Localization Sequence*), el dominio MKB (*MAP Kinase Binding Domain*), también llamado dominio KIM y el dominio DSP (*Dual Specificity Phosphatase*). Los números identifican las posiciones de los aminoácidos que cubre cada dominio. R corresponde a aminoácidos variables en las MKP-2 de distintas especies (102).

I.6.3. 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 fosfatasa nucleares como MKP-1 y MKP-2, una vez que su nivel de expresión aumenta y translocan al núcleo, 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 (103).

Otro mecanismo por el cual las MKPs pueden modular la actividad de MAPK involucra la retención de éstas 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(104).

Las MKPs regulan los procesos en los que participan las MAPKs no solo por la inactivación directa de estas quinasas sino también por unión a ellas, impidiendo la interacción con otros reguladores y/o sustratos o secuestrándolas en determinados compartimentos celulares como se mencionó en el caso de MKP-3. Este efecto es observado con una mutante catalíticamente inactiva de MKP-1, la cual presenta una mutación puntual en su sitio catalítico (Cys→Ser) pero mantiene el dominio N-terminal característico de las MKPs que une a las MAPKs. Esta mutante inhibe la señalización intracelular porque mantiene secuestrados a sus sustratos (105).

Diferentes señales rápidamente afectan la transcripción de MKPs y generan modificaciones postraduccionales que afectan su estabilidad, lo cual les permite ejercer así un control dinámico sobre la actividad de las MAPKs. En muchos casos los mismos sustratos modulan la inducción de las MKPs. Como ejemplo, la expresión de fosfatasas específicas de ERK1/2 como DUSP5 y DUSP6/MKP-3 en respuesta a factores de crecimiento y mitogénicos es mediada por la actividad de la misma ERK1/2 (106, 107) (mecanismo ejemplificado en la Figura 4 A). Esto forma un control de retroalimentación negativa en el camino de ERK que es temporalmente distinto a, por ejemplo, el mecanismo de desensibilización e internalización del receptor.

Muchas MKPs se expresan en muy bajos niveles en condiciones basales y son inducidas por diversos estímulos. Se piensa que estas MKPs influyen sólo las fases de respuesta sostenida de las MAPKs, mientras que las MKPs que se expresan constitutivamente pueden potencialmente influir en todas las fases de actividad de sus sustratos. Una consecuencia lógica de este tipo de regulación, es que algunos estímulos pueden hacer que la célula mantenga una memoria temporal a través de cambios en el repertorio de las MKPs. Este repertorio es capaz de modular los efectos de señales subsecuentes (véase la Figura 4 B) (108). Un ejemplo de este mecanismo fue descrito en neuronas de la línea PC12, donde el factor de crecimiento nervioso (NGF) promueve la activación de ERK1/2 y estimula la expresión de MKP-3, de manera que los niveles de MKP-3 se mantienen elevados hasta después de 5 días de estimulación, período que coincide con la diferenciación de las células (109). Se ha determinado que NGF falla en activar ERK1/2 si previamente las células son expuestas al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o a 9-cis retinal, dos estímulos que inducen fuertemente la expresión de MKP-3 (109).

Numerosas evidencias sugieren que las MKPs conectan diferentes vías de transducción de señales. Por ejemplo, MKP-1 se induce por distintos mecanismos dependientes de ERK, y/o p38, y una vez inducida, puede controlar la actividad de ERK, JNK y p38. De esta manera la inducción de MKP-1 mediada por ERK regula eventos dependientes de p38 porque MKP-1 es capaz de desfosforilar a p38 (110), como se muestra en la figura 4 C. Esto explicaría porque el suero, capaz de inducir MKP-1, cuando esta presente en el medio de cultivo ejerce un efecto protector contra el daño celular inducido por H₂O₂, un potente activador de p38.

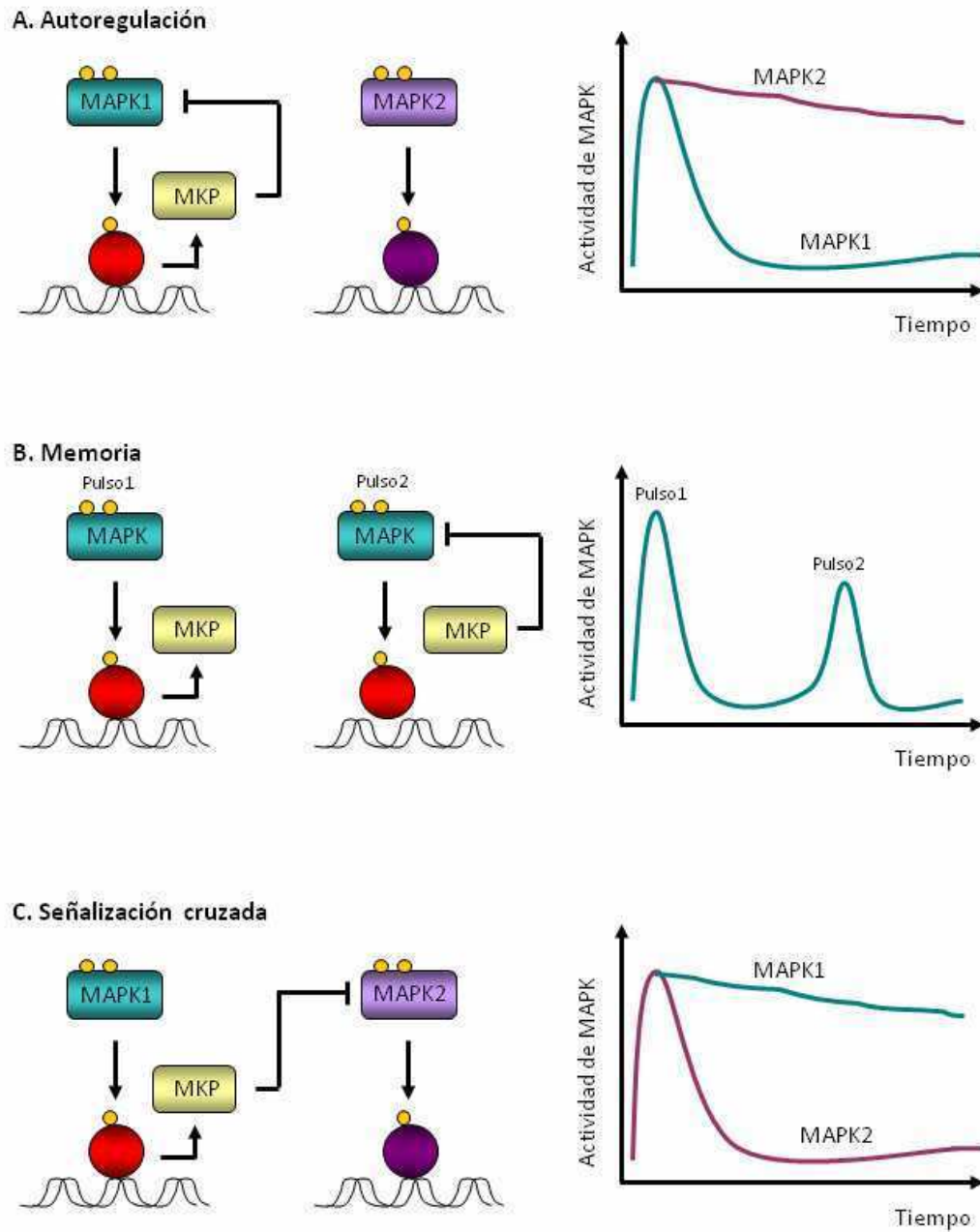


Figura 4. MKPs como reguladores de la vía de señalización de las MAPKs. Los diagramas de señalización a la izquierda muestran diferentes posibilidades con respecto a la regulación de las MKPs y a su acción sobre las MAPK. Los gráficos a la derecha ilustran como se modifica la actividad de las MAPKs a lo largo del tiempo como resultado de la regulación por MKPs. MAPK1 y MAPK2 representan quinasas genéricas que responden a una señalización prolongada y desensibilización lenta. Las MKPs pueden actuar en *loops* autoregulatorios en respuesta a señales sostenidas e inactivar a las MAPK que inducen su expresión (A). Las MKPs también pueden ser inducidas por señalización transitoria dependiente de MAPKs y luego alterar la respuesta a señales subsecuentes (B). Otra posibilidad es que las MKPs inducidas por la actividad de una dada MAPK puede tener como sustrato preferencial a otra MAPK, causando un entrecruzamiento de señales (C)

I.6.4. Regulación transcripcional y post-traducciona de las MKPs

Una característica importante de las proteínas que tienen un rol en la regulación fina de cascadas de señalización es el hecho de que su regulación se ejerce en múltiples niveles. Este es el caso de las MKPs. Algunas MKPs son proteínas lábiles, una característica de las proteínas codificadas por genes de respuesta temprana, y por lo tanto se encuentran en niveles bajos o nulos en células en reposo y su expresión aumenta por estimulación (por factores de crecimiento o distintos tipos de estrés). Otras enzimas se expresan con una cinética más lenta que las anteriores, también en respuesta a diferentes tipos de estímulos. Por ejemplo, la expresión de MKP-2 es inducida por estímulos como estrés oxidativo (111), FGN (112), senescencia en fibroblastos (113), GnRH en gonadotrópos (114), entre otros. Sin embargo, la cinética y magnitud de la respuesta de cada MKP a los diversos estímulos es célula y contexto específico. Esta inducción es en general dependiente de la activación de MAPKs, de esta manera la inducción de MKPs mediada por ERK1/2 constituye un mecanismo de retroalimentación negativa para darle final a las señales mitogénicas. La inducción de MKPs por determinados estímulos también depende de otras quinasas, como PKA y PKC. Generalmente estas quinasas participan en la activación de ERK1/2 por esos estímulos. 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 descrito la participación de PKA en la inducción de MKP-1 en células adrenocorticales estimuladas por ACTH, (115). En esas células, en las que ACTH promueve la activación de ERK1/2, la preincubación con un inhibidor de PKA reduce el incremento en los niveles del ARNm de MKP-1 alcanzados por el estímulo hormonal, lo cual sugiere que la inducción de MKP-1 es parcialmente dependiente de PKA. Incluso se postula que PKC participa la inducción de MKP-1 por ACTH. También se ha visto que, en fibroblastos de ratón, 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 fosfatasa demostrando fehacientemente la participación de ERK1/2 en este proceso (116, 117).

Al igual que MKP-1 y MKP-2, la isoforma MKP-3 también es una enzima regulada a nivel transcripcional. Aunque MKP-3 se expresa constitutivamente en algunos tipos celulares, se ha demostrado que factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico y el NGF promueven su inducción (118).

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, llegando a un máximo de expresión luego de 3 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 (119, 120).

Está documentado que algunos miembros de la familia de las MKPs también se regulan a nivel post-traducciona. Se ha demostrado que la fosforilación de MKP-1 por ERK1/2 en los aminoácidos Serina 359 y Serina 364 reduce el grado de ubiquitinación y degradación proteosoma de MKP-1, promoviendo de esta forma su estabilización (116). En contraposición a esto, existe un trabajo que demuestra que la activación de ERK1/2 induce la ubiquitinación y degradación de MKP-1 (121). Estas discrepancias se pueden explicar por los hallazgos recientes del grupo de Lin y Yang obtenidos en una línea celular humana. Ese grupo demostró la fosforilación de MKP-1 en otros sitios, distintos a las Serina 359 y Serina 364 descritos por Brondello y colaboradores, los que están relacionados con la degradación de MKP-1 (122). 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.

Aunque MKP-2 es una fosfatasa muy poco caracterizada a la fecha, actualmente se conoce que en células de tumor mamario humano MKP-2 se fosforila por ERK1/2 en los residuos de Serina 386 y Serina 391 y que esto impide su degradación (123). Otro estudio demuestra que en fibroblastos senescentes humanos los niveles de la proteína MKP-2 se incrementan como resultado de una reducción en la actividad del proteosoma, lo cual se condice con la participación de esa maquinaria enzimática en la degradación de MKP-2. Como resultado del incremento en los niveles de MKP-2 se reducen los niveles de pERK1/2 en el núcleo y disminuye la proliferación que se observa en los fibroblastos senescentes (113).

Con respecto a MKP-3, también se ha descrito que puede ser regulada a nivel post-traducciona por fosforilación, una modificación que altera la vida media de la proteína. Las conclusiones sobre este tema son controversiales, ya que se ha reportado que la fosforilación por ERK puede tanto disminuir (124) como incrementar la estabilidad de la proteína (125).

Otro tipo de modificación post-traducciona descrito para las MKPs es la acetilación. Se ha demostrado que MKP-1 se acetila en células RAW –línea celular derivada de macrófagos humanos– expuestas a lipopolisacáridos (LPS). La acetilación ocurre en el aminoácido Lisina 57 que se encuentra dentro del dominio de unión al

sustrato y esta modificación regula la habilidad de MKP-1 para interactuar con su sustrato, p38 (126). De esta manera, la acetilación contribuye en la terminación de la señalización inflamatoria activada por LPS en macrófagos.

I.6.5. Función biológica de las MKPs

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

Las MKPs, por su acción sobre ERK1/2 y p38, participan en la regulación de la proliferación celular y apoptosis. Así por ejemplo la sobre-expresión de MKP-1 en células tumorales anula el efecto apoptótico de diferentes agentes como el cisplatino (127), inhibidores del proteasoma (128) y radiación UV (129). En células normales, también se observó el rol antiapoptótico de MKP-1 principalmente por su capacidad de inactivar a p38 y JNK, las que se caracterizan por su acción inductora de apoptosis. Por ejemplo, en linfocitos T el tratamiento con cisplatino provoca la activación de JNK, aumenta los niveles de AP-1 (factor de transcripción que se presenta como una proteína heterodimérica compuesta por proteínas provenientes de las familias c-Fos, c-Jun, ATF y JDP) e induce apoptosis. En este modelo la sobre-expresión de MKP-1 inactiva JNK y esto impide la fosforilación y activación de c-jun disminuyendo así la transcripción del inductor de la apoptosis FAS-L (130).

La inactivación de ERK1/2 por MKP-1 resulta en la inhibición del ciclo celular. Estudios realizados en ratones muestran que la proliferación de macrófagos requiere sólo un corto período de fosforilación de ERK1/2, mientras que la activación de los mismos requiere un período más extenso de fosforilación. En este sistema la duración del estado de fosforilación de ERK1/2 es controlado por MKP-1, de modo que la inhibición de MKP-1 por citoquinas tales como IFN- γ bloquea la proliferación en macrófagos e induce su activación. Por lo tanto, MKP-1 tiene una función decisiva entre la proliferación y activación de macrófagos debido su rol modulador en la actividad de ERK1/2 (131).

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 desencadena una respuesta inflamatoria que depende de la activación de NF κ B y 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. Se demostró que MKP-1 actúa como

regulador negativo de la respuesta inmune innata, por su acción sobre las MAPKs, como surge de experimentos realizados en ratones que no expresan MKP-1 (-/-). Ante el desafío con LPS estos animales producen grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias y desarrollan hipotensión y falla multiorgánica con mayor frecuencia que los ratones normales (132).

Trabajos posteriores ponen en evidencia que MKP-2 también tiene un rol modulador de la respuesta inmune, aunque con un efecto opuesto a MKP-1. Experimentos realizados utilizando como modelo experimental ratones *knock out* para MKP-2 permitieron concluir que su expresión reduce la actividad de ERK. La desforilación de ERK inducida por MKP-2 disminuye la fosforilación y estabilización de MKP-1, por lo tanto en ausencia de MKP-1 se pierde el efecto inhibitorio que ésta ejerce sobre la respuesta inflamatoria en estos ratones (133). Más aún, en ese mismo modelo experimental se demostró un rol modulador similar para MKP-2 en la respuesta inflamatoria inducida por la infección por *Leishmania mexicana* (134).

Además del ampliamente documentado rol de las MKPs en la regulación de la respuesta inflamatoria, existen estudios que muestran la relevancia de estas fosfatasas en cáncer. Dado que la actividad de las MAPKs repercute en muchos de los procesos que definen la génesis del cáncer, ha sido de interés el estudio de la familia de fosfatasas que actúan para específicamente regular la fosforilación y actividad de estas quinasas en mamíferos. El camino de señalización de ERK se asocia con la habilidad de las células cancerosas a crecer independientemente de señales de proliferación y se sabe que está desregulado en aproximadamente un 30% de los tumores humanos (135). Estudios en tumores de ovario muestran una alta expresión de MKP-2 en particular en el tipo de tumor llamado “serous borderline tumours” (SBT) que, comparados con otros tipos de tumores, presentan un fenotipo más benigno por no presentar invasión del estroma. Es por esto que se especula que MKP-2 podría jugar cierto rol en el comportamiento más benigno de éstos tumores mediante la supresión de eventos dependientes de ERK1/2 asociados con la degradación de la matriz extracelular (136). La sobre-expresión de MKP-2 también fue reportada en líneas celulares de cáncer pancreático donde existe una mutación activadora de K-Ras (137). Otro estudio ha revelado que tanto MKP-1 como MKP-2 se sobreexpresan en tumores malignos de mama, pero no en tumores benignos, y esta sobre-expresión se asocia con una reducción en la actividad de JNK1 (138).

Está documentada la participación de las MAPKs activadas por estrés como JNK y p38 en la quimioresistencia. En células de cáncer de pulmón se observaron altos niveles de expresión de MKP-1 acompañado de resistencia a la droga

terapéutica cisplatino mientras que el bloqueo de la expresión de MKP-1 por un siRNA específico causa un aumento en la sensibilidad al cisplatino (139).

Se postula que aquellos tratamientos que inducen MKP-1 y/o MKP-2 son capaces de modular la subsiguiente respuesta celular a otros agentes que actúan vía MAPKs. En estos casos, los niveles altos de MKP-1/MKP-2 permanecerían como parte de la “memoria celular” responsable de la respuesta a posteriores estímulos. Por ejemplo en células derivadas de feocromocitoma de médula adrenal de rata de la línea PC12, MKP1 y MKP2 son transcripcionalmente inducidas por estimulación con NGF. En este sistema, el tratamiento con NGF reduce la activación de JNK inducida por luz UV (140), lo cual se explica por la capacidad de MKP-1 y MPK-2 de reducir la actividad de JNK.

Por otra parte cabe enfatizar que muchos de los efectos biológicos de las MKPs de localización nuclear como MKP-1 y MKP-2 descritos en esta sección involucran un cambio en la transcripción génica mediante un mecanismo común: estas MKPs inactivan a las MAPK en el núcleo y reducen la actividad de factores de transcripción dependientes de estas quinasas. Una de las primeras observaciones sobre este tema proviene de un trabajo realizado en cardiomiocitos de rata. Se observó que la sobre-expresión de MKP-1 altera la actividad transcripcional de diversos genes involucrados en la hipertrofia inducida por fenilefrina, entre otros estímulos (141).

La bibliografía demuestra que numerosas hormonas, factores de crecimiento y otros ligandos regulan la expresión y actividad de MKPs. Uno de los primeros trabajos en este tema demostró que, en hepatocitos de rata, el glucagon estimula la expresión del mensajero y proteína de MKP-1, cuyo rol biológico fue asociado a la modulación de la fosforilación de MAPKs (142). Más aún, nuestro grupo de trabajo también a hecho aportes en este tema al demostrar la inducción de MKP-1 por hormonas esteroideogénicas y el papel de esta enzima en un proceso crucial para la síntesis de esteroides. Dado que este trabajo se centrará en el estudio de la acción de hormonas esteroideogénicas sobre MKP-2, profundizaremos en este tema en secciones siguientes.

II. PARTICIPACIÓN DE MAPKs EN LA ACCIÓN DE LAS HORMONAS LUTEINIZANTE Y ADRENOCORTICOTROFINA

Las hormonas luteinizante (LH) y adrenocorticotrofina (ACTH) controlan la producción de esteroides en testículo y glándula adrenal respectivamente. El mecanismo de acción de ambas hormonas incluye la actividad de MAPKs, por lo tanto la producción esteroides bajo el estímulo de las hormonas mencionadas es un proceso fisiológico susceptible de ser modulado por la actividad de no sólo de MAPKs sino también de las MKPs. En este trabajo se usará como modelo experimental una línea celular de células de Leydig de testículo bajo un estímulo que provoca la activación del receptor de LH. Por lo tanto en esta sección describiremos los sistemas productores de esteroides, la regulación hormonal de la esteroidogénesis y el sistema experimental usado en este estudio en particular.

II.1. BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

Distintos tejidos como la glándula adrenal, gónadas, placenta y sistema nervioso central producen un tipo de hormonas, de estructura derivada del colesterol, con importantes acciones regulatorias sobre diversos procesos. Estas hormonas se denominan esteroides y son responsables del funcionamiento armónico del organismo ya que controlan procesos relacionados con el metabolismo, el equilibrio hidrosalino, el desarrollo de los caracteres sexuales, la fecundación, entre otros.

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 (143, 144).

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.

La biosíntesis de esteroides, esquematizada en la Figura 5, se inicia con la conversión de colesterol a pregnenolona (o P5). 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 P450scc) (145, 146).

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 endoplásmico 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 Δ^5 a Δ^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 (147), 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 17β -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 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.

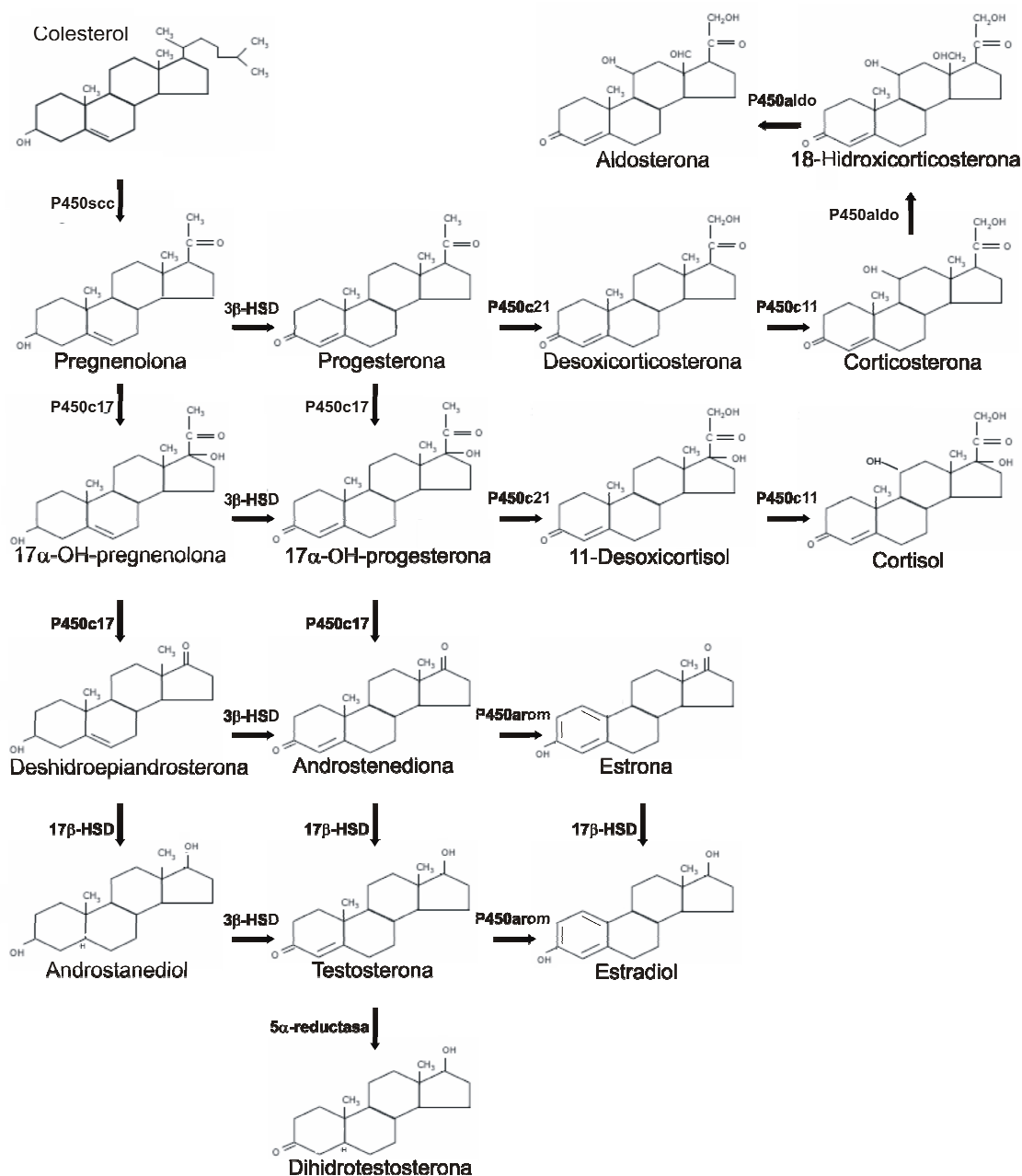


Figura 5: Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroideas. Referencias: P450scc: complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol; 3β-HSD: 3β-hidroxioesteroide deshidrogenasa; P450c17: 17α-hidroxilasa/17,20-liasa; P450c21: 21-hidroxilasa; P450c11: 11β-hidroxilasa; P450aldo: aldosterona sintasa; P450arom: aromataza; 17β-HSD: 17β-hidroxioesteroide deshidrogenasa

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.2. TEJIDOS PRODUCTORES DE HORMONAS ESTEROIDES

II.2.1. 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 (148) (Figura 6). 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 (149). Las hormonas hipofisarias folículo estimulante (FSH) y 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.

Testículo

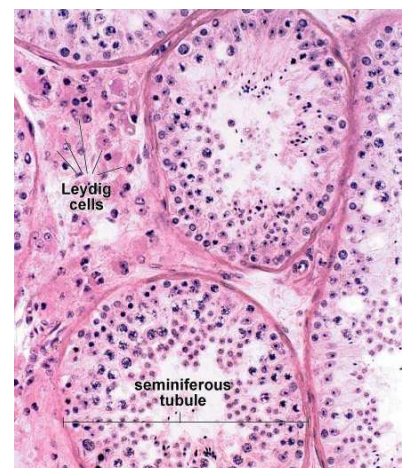
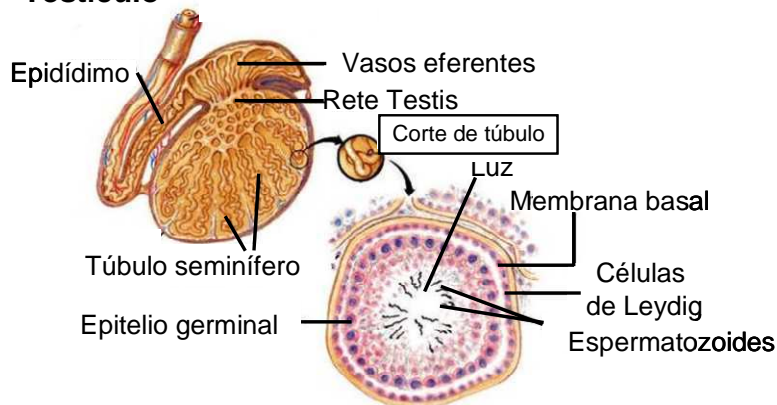


Figura 6: Testículo de mamífero. Detalle de la organización celular del túbulo seminífero (izquierda) y corte histológico de testículo (derecha).

II.2.2. Glándulas adrenales y ovario

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. 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.

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 (Ang II) (150-152). 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 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 17 β -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.

II.2.3. Otros tejidos productores de esteroides

La placenta también sintetiza esteroides. Este tejido 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 dos esteroides mayoritarios sintetizados por este tejido.

También el sistema nervioso central sintetiza hormonas esteroides. Actualmente se conoce que este tejido produce hormonas esteroides y que las mismas modulan procesos fisiológicos y patológicos de este tejido (153). El colesterol utilizado en la neuroesteroidógenesis proviene de la síntesis local (154), ya que las

lipoproteínas que transportan el colesterol no atraviesan la barrera hematoencefálica. El colesterol es transformado a pregnenolona, como en los tejidos esteroideogénicos 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 (155).

II.3. HORMONAS ESTEROIDOGÉNICAS Y SU MECANISMO DE ACCIÓN

II.3.1. Hormonas Esteroideogénicas

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) (156). El procesamiento del POMC genera las hormonas ACTH, α y β -melanocito estimulante (MSH), β -lipotropina (LPH) y β -endorfinas. Las hormonas LH, FSH y ACTH son hormonas que promueven la esteroideogénesis en gónadas y corteza adrenal. La LH y la FSH son glicoproteínas de 32 kDa constituidas por una subunidad α común a ambas, y una subunidad β característica de cada una. 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 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.

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 Ang II es un péptido que regula la síntesis de mineralocorticoides en la ZG.

II.3.2. Mecanismo de acción de hormonas esteroideogénicas

La unión de las hormonas LH y ACTH a sus respectivos receptores dispara una cascada de señalización que involucra eventos comunes. Si bien Angiotensina II tiene un mecanismo de acción ligeramente diferente, las cascadas de señalización de todas las hormonas esteroideogénicas convergen en un punto.

En este punto describiremos con más detalle el mecanismo de acción de LH, por ser tema central de este trabajo.

-Activación del receptor de LH

LH ejerce su acción mediante un mecanismo que se inicia con la unión a su receptor de la membrana plasmática (4, 157). Este receptor específico pertenece a la familia de los 7TMS y tiene la particularidad de ser reconocido también por la hormona GC. Esta particularidad explica porque muchos trabajos en este tema han sido realizados utilizando GC. Por razones prácticas suele usarse GC de origen humano (hCG).

La activación del receptor de LH, como así también el receptor de ACTH, promueve un aumento de los niveles intracelulares de AMPc y la activación de la PKA, con lo que consecuentemente, la fosforilación de proteínas regulatorias en Serina y Treonina (3, 4, 158, 159). La activación de PKA en respuesta a LH o ACTH desencadena la respuesta celular específica: la síntesis y secreción de hormonas esteroideas.

Aunque la regulación aguda y crónica de la esteroideogénesis en células de Leydig por LH está básicamente mediada por proteínas fosforiladas por la acción de PKA, esta hormona también promueve la activación de otras proteínas quinasas. Asimismo, otras vías de transducción de señales como las activadas por PKC y Ca^{2+} /calmodulina quinasa (CaMK) también participan en la acción de LH (160, 161).

Como ocurre con LH, la unión de ACTH a su receptor de membrana también desencadena la activación de otras quinasas, además de la activación de PKA. Se ha demostrado que ACTH aumenta la actividad de ERK1/2, JNK1/2 y PKC y la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (162-164).

Angiotensina II ejerce su acción sobre la esteroideogénesis mediante su unión a un receptor también del tipo 7TMS. Sin embargo, su activación provoca la activación de una proteína Gq, a diferencia de LH y ACTH que activan una proteína G del tipo Gs, de manera que la activación de este receptor lleva a un incremento de los niveles de Ca^{2+} y diacilglicerol, que a su vez conducen a la activación de PKC (165). La fosforilación de proteínas regulatorias en residuos de Serina y Treonina por PKC es un evento necesario en la acción de Ang II sobre la producción de esteroideas. Estas

proteínas son las mismas que se fosforilan por PKA como resultado de la activación del receptor de LH y ACTH, en línea con el hecho que PKA y PKC en general fosforilan los mismos sustratos.

- Las MAPKs en el mecanismo de acción de hormonas esteroideogénicas

El mecanismo de acción de LH involucra la activación ERK1/2. En gran medida los estudios realizados con relación a este tema, como muchos relacionados con la regulación hormonal de la esteroideogénesis, fueron realizados empleando como modelo experimental células de Leydig de origen murino de la línea MA-10 (166). 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 dependiente de PKA (167, 168) y de la proteína Ras (167).

Muchos aspectos relacionados con el mecanismo de acción de ACTH y la regulación de la esteroideogénesis se conocen a partir de los estudios realizados utilizando como modelo experimental las células adrenocorticales de origen murino de la línea Y1 (169). 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 esteroideogénesis 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 JNK1/2 a través de un mecanismo dependiente de PKC y de Ca^{2+} (170). 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 de células Y1 (170). Se ha propuesto que 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 (171). Sin embargo, trabajos de nuestro y otros grupos señalan la participación de PKA en la activación de ERK mediada por ACTH.

Ang II también promueve la activación de MAPKs. En células adrenales de rata, Ang II promueve la hipertrofia celular, pero no la proliferación, efecto involucra la activación de ERK1/2 y p38 MAPK. (172). Además, en trabajos donde se indaga el rol de Ang II en la iniciación y progresión de la senescencia vascular, se demuestra que el mecanismo de señalización involucra la activación del receptor de Ang II tipo I (AT1)

y la activación de ERK 1/2 (173). Por otra parte, la expresión de las enzimas que degradan a la Ang II es regulada por la propia Ang II vía p38 (174).

En esta sección y la anterior se mencionó que la activación del receptor de LH lleva a la activación de PKA y ERK1/2. Lo mismo ocurre con el receptor de ACTH y otras hormonas que regulan la producción de esteroides en sus respectivos tejidos blanco. La pregunta que surge es ¿cuál es el grado de participación de ambas quinasas en la activación de la esteroidogénesis? Este tema ha sido tópicamente de intenso debate y ha promovido un gran número de investigaciones para tratar de responder 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) y cómo se conecta este sustrato fosforilado y el proceso esteroidogénico. Algunos aspectos relacionados con estos temas se discuten en las secciones siguientes.

II.4. REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESTEROIDOGÉNESIS

En la regulación hormonal de la síntesis de esteroides, en todos los tejidos esteroidogénicos, puede diferenciarse temporalmente dos fases: aguda y crónica. La regulación aguda, a la cual nos referiremos a continuación, se extiende durante algunos minutos luego de iniciado el estímulo. La regulación crónica ocurre en un período más extenso, del orden de varias horas. En el caso de LH, los efectos crónicos incluyen el incremento de la transcripción de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de esteroides (175), manteniendo así la capacidad esteroidogénica. En contraste con lo que ocurre en la fase crónica, en la fase aguda el nivel de enzimas esteroidogénicas permanece constante (176).

En las secciones siguientes discutiremos con más detalle ambas fases de la regulación hormonal de la esteroidogénesis, poniendo mayor énfasis a la acción de LH, o hCG en condiciones experimentales, considerando el tema de esta tesis.

II.4.1. Proteínas que regulan la fase aguda de la esteroidogénesis

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 hormonales agudos se atribuyen principalmente a la fosforilación de proteínas regulatorias en residuos de Serina/Treonina. La fosforilación de proteínas regulatorias en sitios específicos afecta

el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna. En el caso de LH/hCG, como ocurre también con ACTH, esa fosforilación es dependiente de PKA (157, 158).

El paso limitante y hormonalmente regulado de la esteroidogénesis es el transporte de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna (177) y éste ocurre en respuesta a la cascada de eventos disparada por las hormonas esteroidogénicas 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 (177-179) indicando que el complejo P450_{scc} 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 esteroidogénesis fue comprobar que la misma es dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas. 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 P450_{scc}, pero sí el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna (177).

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 como la proteína lábil necesaria para la regulación aguda de la esteroidogénesis.

Dos de las proteínas descritas como intermediarios obligatorios 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*) (180).

El TSPO (18 kDa) es una proteína integral 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 (181). TSPO presenta un dominio que contiene un sitio consenso de unión a colesterol, un colesterol con alta afinidad y es indispensable para la supervivencia (182).

El DBI (**D**iazepan **B**inding **I**nhibitor), al igual que TSPO, está presente en numerosos tejidos, pero se expresa en altas concentraciones en células esteroideogénicas (183). El DBI y los agonistas de benzodiazepinas al unirse a TSPO estimulan el transporte intramitocondrial de colesterol y la esteroideogénesis (184). La expresión de TSPO está regulada por hormonas y diferentes agentes químicos a través de un mecanismo que incluye la participación de PKC ϵ , ERK1/2, AP-1 y STAT3, tanto en condiciones normales como patológicas (185).

Aún cuando TSPO cumple con algunos de los requisitos como para ser considerada la proteína que facilita el transporte de colesterol a la mitocondria en respuesta al estímulo hormonal, la proteína que mejor cumple todos los requisitos como para cumplir esta función es la proteína StAR, a la cual nos referiremos en secciones siguientes.

- 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, 159). 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 (**S**teroidogenic **A**cute **R**egulatory **p**rotein) (186). Actualmente se presume que el precursor de 37 kDa es la forma activa de la proteína (187), que por estimulación hormonal se fosforila por PKA y experimenta clivaje proteolítico secuencial para generar la proteína madura de 30 kDa que se acumula en la matriz mitocondrial (186, 188).

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 Lipoide Congénita (189, 190), 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 (191).

- Regulación hormonal de StAR

Las hormonas esteroideogénicas rápidamente aumentan los niveles de la proteína StAR, aunque son numerosos los factores extracelulares que se han descrito como capaces de alterar estos niveles (192). En adrenal y gónadas, la esteroideogénesis aguda es mediada por mecanismos que aumentan la transcripción del gen STARD1 y síntesis y actividad de la proteína StAR (193-196). En células de Leydig, la expresión y actividad de StAR mediada por LH/hCG es dependiente de PKA (186).

En numerosos trabajos se ha estudiado la regulación transcripcional de StAR focalizando la atención en una variedad de factores de transcripción. 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**) e YY1 (**ying and yang 1**) (197).

Otro mecanismo novel de regulación de StAR está mediado por secuencias antisentido naturales que modulan los niveles del mensajero 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. 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. Más aún, los niveles de este NAT están regulados hormonalmente, lo que pone en evidencia la importancia del mismo en la regulación de la síntesis de esteroides (198).

- Participación de ERK1/2 en la regulación de StAR mediada por LH y ACTH

En secciones anteriores se mencionó que en células adrenocorticales y de Leydig, la estimulación con 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 (199). 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 STARD1.

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 en Serina 56 y Serina 194 son críticos para la actividad de esta proteína (200). Su fosforilación por PKA es esencial y obligatoria para su activación y la producción de esteroides.

En células de Leydig de la línea MA-10 y adrenocorticales de la línea Y1 se demostró que la cascada de ERK1/2 es necesaria para la expresión de StAR (199). También se demostró la fosforilación de StAR en mitocondria por ERK1/2 (52). Tanto en células de Leydig como adrenocorticales el bloqueo de la activación de ERK1/2 inhibe la producción de progesterona (P4), esteroide mayoritario producido por las células MA-10.

Aunque se demostró la participación de ERK1/2 en la expresión de StAR y en la producción de esteroides (199), un estudio demostró que la preincubación de las células MA-10 con un inhibidor de MEK que impide la activación de ERK1/2, U0126, disminuye la expresión de StAR cuando el estímulo es el ester de forbol PMA (activador de PKC), pero la aumenta ligeramente cuando el estímulo es AMPc o hCG (168). Los autores postulan que estos resultados contradictorios se atribuirían al hecho de que estos estímulos pueden activar ERK1/2 de manera diferencial y 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. Hay una variante adicional importante a considerar y que puede explicar en parte porqué la inhibición de ERK1/2 inhibe (199) o estimula la esteroidogénesis (168)) según los resultados mencionados. Esta variante es el tiempo de privación de suero previo a la estimulación. La disponibilidad de factores de transcripción suele ser diferente según si se procedió o no a privar de suero los cultivos.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha descrito la formación en la mitocondria de 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 (52). Incluso se demostró que ERK1/2 fosforila a StAR en Serina 232, en reacciones de fosforilación *in Vitro*, y que esta fosforilación es necesaria para la acción de StAR sobre el transporte de colesterol a la mitocondria (52).

En síntesis, se concluye que en células adrenocorticales y de Leydig, ERK1/2 participa en la inducción del gen STARD1 y en activación de StAR mediante un mecanismo que involucra la fosforilación directa de esta proteína en la mitocondria.

II.4.2. Control de la expresión de enzimas esteroidogénicas por estimulación hormonal crónica

La estimulación crónica de las células esteroidogénicas es necesaria para mantener el nivel óptimo de las enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides. Las enzimas P450_{scc} y 3 β -HSD participan en la conversión de colesterol a progesterona, un intermediario en la síntesis de todas las hormonas esteroides. La relevancia de ambas enzimas en la síntesis de todos los esteroides se confirma por el hecho de que mutaciones en los genes correspondientes compromete la producción de esteroides y causa patologías endócrinas potencialmente letales, como ocurre con las mutaciones en el gen de StAR (201). Por lo tanto no resulta sorprendente el control estricto que ejercen las hormonas esteroidogénicas sobre la expresión de ambas enzimas. Sin embargo existen diferencias en tiempo y magnitud en lo que se refiere a la inducción de estas enzimas y la proteína StAR. Las hormonas esteroidogénicas inducen significativamente la expresión de StAR luego de unos pocos minutos de estimulación y producen hasta 10 veces de incremento en los niveles de la proteína, cuando ésta se analiza por Western blot. En cambio el efecto hormonal sobre las enzimas P450_{scc} y 3 β -HSD se detecta luego de varias horas de estimulación e involucra un incremento de los niveles de las proteínas de 2 a 3 veces respecto al control (192).

Los genes que codifican para las enzimas P450_{scc} y 3 β -HSD responden a las mismas hormonas que estimulan la producción de esteroides. Las hormonas promueven la activación de los promotores correspondientes modificando la actividad de una batería de factores de transcripción que determina un perfil de expresión especie- y tejido- específico.

En el contexto de este trabajo de tesis resulta de mayor relevancia analizar los mecanismos que controlan los niveles de P450_{scc} particularmente. En las secciones siguientes nos referiremos a este tema.

II.4.3. Control hormonal de la expresión de P450_{scc}

La enzima P450_{scc} se expresa abundantemente en la glándula adrenal, gónadas, placenta y en menor medida en cerebro, piel e intestino (202). Muchos

factores derivados del suero o producidos localmente y que incrementan la expresión de STARD1 y la esteroidogénesis, también aumentan la expresión de CYP11A1. En testículo y ovario, las gonadotropinas son los principales reguladores de la expresión de CYP11A1. LH y FSH, como los análogos del AMPc en ensayos *in vitro*, estimulan la actividad del promotor de CYP11A1 (202). En células de Leydig, los niveles de P450_{scc} son altos en condiciones basales y se incrementan en respuesta a LH o hCG, aunque más tardíamente que StAR. Otras hormonas y factores de crecimiento que aumentan la expresión del gen CYP11A1 son la hormona tiroidea y TGFβ en células de Leydig inmaduras de rata, en tanto que los glucocorticoides, TGFβ, TNFα y leptina tienen un efecto inhibitorio sobre la expresión de este gen. Por lo tanto, numerosos moduladores endócrinos, parácrinos y autócrinos contribuyen a la expresión de CYP11A1 en células de Leydig (202).

- Regulación transcripcional de CYP11A1

Las respectivas hormonas tróficas estimulan, a través de un mecanismo mediado por AMPc, la acumulación del ARNm de CYP11A1 en cultivos primarios de adrenales de diferentes especies, en placenta y en células de ovario y de testículo. En células de Leydig MA-10, el 8Br-AMPc -análogo permeable del AMPc- incrementa 2 veces la síntesis de la proteína P450_{scc} y 10 veces la síntesis progesterona (203). El mismo estímulo también aumenta significativamente los niveles del ARNm a partir de las 2 horas de estimulación. Este efecto es máximo a las 8 horas (3 veces respecto al control) y es dependiente de la activación transcripcional (203).

Las secuencias reguladoras del gen CYP11A1 han sido caracterizadas utilizando como modelos experimentales tanto cultivos celulares como ratones transgénicos. Muchos elementos reguladores *cis* fueron identificados por el análisis del promotor del gen con la región flanqueante 5' suprimida. Estos estudios permitieron conocer que el promotor de CYP11A1 contiene: elementos reguladores basales que se extienden desde la secuencia consenso TATA *box* hasta aproximadamente la posición -130, una región reguladora más distante desde las posiciones -130 a -500, una secuencia respondedora a AMPc (U-CRS) en la posición -1600 y un *enhancer* (AdE) en la posición -1850 (Figura 7).

La región más proximal del promotor controla la actividad basal en todos los tejidos esteroidogénicos; esto incluye la secuencia consenso TATA *box* en la posición -24/-29, un sitio de unión a SF-1 en -38/-46 y una secuencia de unión a Sp1 en la posición -101/-111 (202, 204, 205).

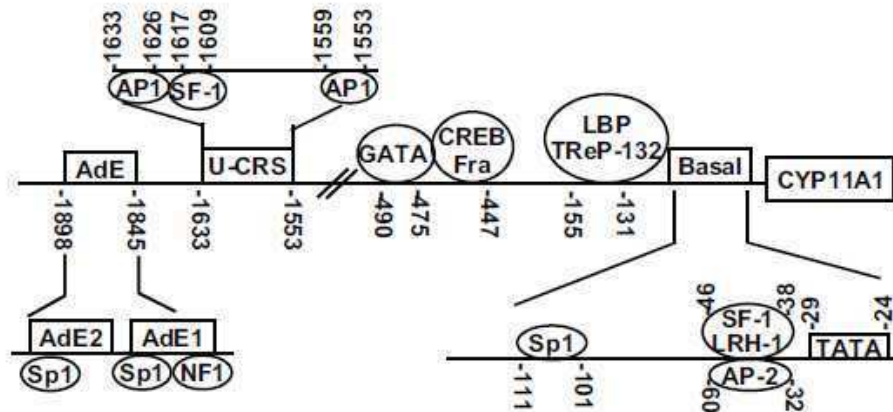


Figura 7: Diagrama del promotor del gen CYP11A1 y los sitios de unión de proteínas reguladoras. La región del promotor está representada como una línea horizontal y el gen CYP11A1 se muestra como un rectángulo contiguo a la línea. Los elementos reguladores más importantes están indicados en rectángulos sobre la línea. Las proteínas que se unen a estos sitios están representadas en círculos. Basal: promotor basal; U-CRS: secuencia respondedora a AMPc; AdE: *enhancer* adrenal.

II.4.3. Mediadores en la regulación hormonal de la transcripción del gen CYP11A1.

- Importancia de SF-1 en el control de la expresión de CYP11A1

En gónadas y adrenales el promotor de CYP11A1 es regulado por SF-1. Esto se evidencia por el hecho de que la sobreexpresión de SF-1 induce la transcripción de CYP11A1 en células de la teca bovinas y en células de Leydig de rata de la línea K28, mientras que en ratones que no expresan SF-1 se pierde totalmente la expresión de P450scc en los testículos (206). Otra observación con respecto al papel de SF-1 en la expresión de CYP11A1 proviene de estudios realizados en ratones transgénicos que presentan una mutación en el promotor de ese gen, en el sitio más proximal para SF-1. Estos animales exhiben solo una reducción en los niveles de esteroides testiculares y adrenales pero una disminuida sensibilidad en la producción esteroides adrenales frente a situación de estrés. Por su parte, la expresión de P450scc en ovario y placenta de estos animales es normal. Estos estudios sugieren que este sitio proximal para SF-1 en el promotor de CYP11A1 no es esencial para la producción de P450scc, quizá por la existencia de elementos compensadores (206). El segundo sitio para SF-1 –que reside en la región comprendida entre -1609 y -1617, dentro de la región U-CRS– tiene un papel tejido-específico en la regulación del promotor.

El sitio proximal para SF-1 se superpone con el sitio de unión a AP-2. La familia de factores de transcripción AP-2 (**A**ctivation **P**rotein-2) comprende cinco miembros, descritos en humano y ratón: AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ , AP-2 δ y AP-2 ϵ . Datos

experimentales sugieren que en placenta de ratón y humano, es AP-2 el factor de transcripción mas relevante para el control de la expresión de CYP11A1 (206).

- Otros factores de transcripción reguladores de la transcripción del gen CYP11A1

La sobreexpresión de GATA4 o GATA6 en células adrenocorticales y en células de ovario y endometrio humano, COS-1 y HeLa respectivamente, incrementa la expresión de CYP11A1, lo cual evidencia que en los tipos celulares mencionados el promotor es capaz de responder a esos factores de transcripción (207). Además, un análisis *in silico* indica potenciales sitios GATA en los primeros 1000 pb del promotor del gen CYP11A1 de humanos, vaca, cerdo, rata y ratón, sin embargo, sus ubicaciones y número no son conservados (206). En el promotor murino, un sitio que une GATA4 se localiza en la región comprendida entre -475 y - 470. Contiguo a este sitio se encuentra un sitio CRE que une CREB-1 y que contribuye a la transcripción basal de CYP11A1.

El factor c-Jun, solo o en combinación con c-Fos, se une a la región U-CRS (-633 al -1553) del promotor humano y promueve su activación en células adrenocorticales Y1. Además, c-Jun coopera con SF-1 para dirigir la actividad del promotor a través de la región U-CRS (206).

La región proximal del promotor de CYP11A1 contiene uno o más sitios Sp1. Esta región coopera con el sitio proximal de SF-1 para activar la transcripción basal y estimulada por AMPc en células Y1. Además se conoce que la sobreexpresión de Sp1 incrementa la actividad basal de CYP11A1 en células de granulosa y Y1 (207). El promotor bovino y murino presenta un segundo sitio de unión para Sp1 en la región -70 a -32.

Existe una región *enhancer* entre la posición -1898 a -1845 del promotor humano de CYP11A1 que contiene dos sitios imperfectos de unión a Sp1. Ambos controlan la actividad basal del promotor en células Y1.

DAX-1 es un receptor huérfano que regula negativamente la expresión de StAR. Su expresión se inhibe por la acción de hormonas esteroideogénicas y en los diferentes tejidos esteroideogénicos exhibe un perfil similar a SF-1. Se demostró que la sobreexpresión de DAX-1 en células adrenocorticales disminuye la expresión de CYP11A1 (207).

- Rol de ERK1/2 y JNK en la inducción de CYP11A1

Está ampliamente descripto que múltiples caminos de señalización convergen en la activación del factor de transcripción Sp1, y que esta activación incluye diferentes

quinasas incluyendo ERK1/2, Akt y JNK1/2. En particular con respecto a ERK1/2 se han identificado dos sitios de fosforilación en Sp1, en Treonina 453 y 739. La fosforilación de estos sitios lleva a cambios en la funcionalidad de Sp-1, modificando así su acción sobre sus genes blanco. En la sección anterior se mencionó que Sp1 interviene en la regulación de la transcripción del gen CYP11A1, por lo tanto es esperable una conexión entre la activación de ERK1/2 y la transcripción de CYP11A1.

Recientes estudios reafirman la participación de ERK1/2 en la expresión de CYP11A1. En células de Leydig de ratón adulto que portan una delección específica para MEK1 y MEK2, se detectó una disminución significativa en la expresión de varios genes esteroideogénicos, entre ellos STARD1 y CYP11A1 (208). Por su parte, Denner y colaboradores han demostrado que en células de granulosa porcina, la estimulación con IGF lleva a la activación de ERK1/2, a la consecuente fosforilación de Sp1 y a la activación transcripcional del gen CYP11A1 (209). En este trabajo se demuestra además que en condiciones basales, ERK1/2 fosforilado se encuentra secuestrado por la proteína PSF (*Polypirimidene tract-binding protein-associated Splicing Factor*) y que luego de la estimulación con IGF, se libera, pudiendo translocarse al núcleo y fosforilar a Sp1 (209). En síntesis, podría ser Sp1 el factor de transcripción que conecta la actividad de ERK con la expresión de CYP11A1.

También la actividad de JNK parece estar involucrada en la activación del gen CYP11A, al menos en células adrenocorticales. En células de la línea Y1 se demostró que la expresión del gen CYP11A1, tanto basal como estimulada por 8Br-AMPC, depende de c-jun y de la proteína quinasa HIPK3 (*Homeodomain-interacting protein kinase 3*). Este trabajo demuestra que la estimulación con 8Br-AMPC promueve la fosforilación de JNK y c-Jun por la quinasa HIPK3 y que estas fosforilaciones son necesarias para la transcripción de CYP11A1 (210).

Estos antecedentes demuestran la participación de MAPKs en la transcripción de CYP11A1 y por lo tanto ponen en evidencia el potencial rol de MKP-2 como modulador de la actividad de ERK1/2 y JNK y, consecuentemente, de la transcripción del CYP11A1. Este trabajo se focaliza en determinar si la expresión de MKP-2 y de CYP11A1 están relacionadas.

III. PARTICIPACIÓN DE FOSFATASAS EN LA ACCIÓN DE HORMONAS 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, resulta de interés caracterizar los procesos de desfosforilación de proteínas en estos sistemas, incluyendo las enzimas y los correspondientes sustratos.

Para aquellos procesos regulados por LH/ACTH vía PKA es importante conocer no sólo las serina/treonina fosfatasas que intervienen en el balance del grado de fosforilación de las proteínas reguladas por acción hormonal, sino también 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.

III.1. REGULACIÓN POR LH/ACTH DE PROTEÍNA FOSFATASAS

III.1.1. Regulación de Proteína Serina/Treonina Fosfatasas por LH/ACTH

Teniendo en cuenta el rol relevante que tiene la fosforilación de proteínas en residuos de Serina/Treonina en la regulación de la esteroidogénesis, es entendible que las primeras investigaciones relacionadas con las proteínas fosfatasas de células productoras de esteroides se focalizaran en la regulación de Serina/Treonina fosfatasas. Estos primeros estudios analizaron particularmente la regulación de la fosfatasa PP1. Iyer y col. demostraron que en células de la corteza adrenal ACTH produce la fosforilación y activación de I1, un inhibidor de PP1, en forma dependiente del tiempo y de la dosis (211). Estos resultados sugieren que los procesos de desfosforilación de proteínas en residuos de Serina y Treonina mediados por PP1 se inhiben por ACTH.

Los trabajos relacionados con las serina/treonina fosfatasas en células esteroidogénicas posteriores a los de Iyer y col. tenían como objetivo establecer el papel de estas enzimas en la regulación hormonal aguda de la esteroidogénesis. 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

estos compuestos inhiben la producción de esteroides estimulada por la hormona o el segundo mensajero en células de ZG y de ZF de la corteza adrenal bovina. Consistentemente con este hallazgo, Jones y col. demostraron que los inhibidores mencionados bloquean la inducción de la proteína StAR por AMPc (212). A partir de estos conocimientos se postuló que la actividad de serina/treonina fosfatasa es un requerimiento para la acción hormonal sobre la producción de esteroides (213). Sin embargo esta conclusión parece ilógica si se tienen en cuenta los resultados de los trabajos de Iyer y col. (211), ya que estos demuestran que la estimulación hormonal lleva a la inhibición de una fosfatasa de Serina/Treonina.

En oposición a los estudios discutidos en el párrafo anterior, en nuestro laboratorio se demostró que en células de Leydig MA-10 la actividad de PP2A es inhibida por AMPc (214). En ese trabajo también se comprobó que los inhibidores de Serina/Treonina que inhiben la esteroidogénesis, inhiben también la síntesis proteica. Estos resultados sugieren que la inhibición de la síntesis proteica impide la inducción de StAR promovida por la hormona o el segundo mensajero y por lo tanto la síntesis de esteroides.

En células adrenocorticales Y1 también se demostró 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) (215). 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 comprobó que las fosfatasas coinmunoprecipitaban 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 incubación de las células con inhibidores de serina/treonina fosfatasas 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.

III.1.2. Regulación de Proteína 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 (216).

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 más o menos plana según el tipo celular a una forma redondeada, efecto evidente 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. 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 (217).

En coincidencia con los hallazgos descritos en el párrafo anterior, en nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento hormonal *in vivo* produce una reducción del contenido de fosfotirosina de proteínas endógenas en ZF de adrenal de rata, 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 (218).

El incremento de la actividad de tirosina fosfatasa por ACTH involucra la activación de tres PTPs en la fracción soluble de ZF de adrenal de rata, cuyos pesos moleculares son 115, 80 y 50 kDa (218). Incluso 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 (219). La PTP de 115 kDa reúne una serie de características que permiten identificarla con PTP-PEST. Además se comprobó que su actividad se incrementa por fosforilación *in vitro* con PKA y que se asocia con la paxilina (85).

En células adrenocorticales bovinas se ha identificado a PTP1D como una tirosina fosfatasa activada por ACTH/PKA (84). En línea con esta conclusión, nuestro grupo ha demostrado que la PTP de 80 kDa de ZF de adrenal de rata que se activa por ACTH es PTP1D (85).

III.1.3. Regulación de Proteínas Fosfatasas Duales por LH/ACTH

Trabajos de nuestro laboratorio demostraron que las hormonas ACTH y LH/hCG ejercen un control estricto también sobre un miembro de la familia de las MKPs, MKP-1. Se demostró que en células adrenocorticales de la línea Y1, ACTH y su segundo mensajero AMPc promueven un aumento rápido y transitorio de los niveles de la proteína y del ARNm correspondiente a MKP-1. Este estudio mostró además que ACTH y 8Br-AMPc incrementan los niveles del ARNm 6- y 4-veces respecto del control

y que un inhibidor de PKA bloquea completamente el efecto del AMPc mientras que sólo ejerce un efecto inhibitorio parcial sobre la inducción mediada por ACTH. Estos resultados permitieron concluir que eventos tanto dependientes como independientes de PKA participan en la acción de ACTH sobre el ARNm de MKP-1 (115). Por otra parte se comprobó que el efecto de ACTH sobre los niveles del mensajero responde a un incremento de la transcripción génica y que el ion Ca^{2+} y la PKC participan en esta inducción.

Teniendo en cuenta que los mecanismos de acción de ACTH y LH tienen elementos comunes, propusimos una regulación de MKP-1 también por acción hormonal en células de Leydig. Primeramente se demostró que el AMPc promueve la acumulación del ARNm de MKP-1 en células de Leydig de la línea MA-10 (220). Luego, profundizando el estudio de la expresión de MKP-1 en ese tipo celular, se demostró que la estimulación con hCG/AMPc incrementa rápida y transitoriamente los niveles de ARNm de MKP-1 a través de la transcripción *de novo* del gen correspondiente (221). Mediante la expresión de una construcción que permite la expresión de MKP-1 unida a una secuencia de reconocimiento (flag) bajo un promotor constitutivo se comprobó que hCG y el segundo mensajero incrementan los niveles de la quimera, poniendo en evidencia una regulación post-traducciona promovida por la hormona a través de un mecanismo dependiente de PKA. En línea con esos resultados se determinó que la proteína es modificada post-traduccionalmente por fosforilación dependiente de ERK en los residuos de Serina 359/364 (221).

La regulación de MKP-1 también se demostró en células adrenocorticales humanas de la línea H295R. En este sistema ACTH incrementa los niveles del ARNm y de la proteína de MKP-1. Ese trabajo demostró además que MKP-1 es sustrato de la PKA en reacciones de fosforilación *in Vitro* (222). Otra hormona esteroideogénica como Ang II también provoca la inducción de MKP-1 en células adrenales bovinas (223).

El conjunto de todos los antecedentes mencionados en esta sección dejan en claro 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 de la esteroideogénesis.

Los trabajos mencionados sobre la regulación de MKP-1 ponen en evidencia que un mecanismo de regulación involucra cambios en los niveles de su expresión. Este mecanismo tiene una cinética lenta si se compara con el que corresponde a la modulación de la actividad de tirosina fosfatasa por modificación covalente, por

ejemplo la activación por fosforilación de las tirosina fosfatasas promovida por hormonas esteroideogénicas. Por lo tanto en células esteroideogénicas, las hormonas tróficas correspondientes son capaces de producir el cambio en la actividad de tirosina fosfatasas por dos mecanismos diferentes: la activación rápida de PTPs por fosforilación y la inducción de al menos un miembro de la familia de fosfatasas duales como MKP-1. El presente trabajo expande el estudio a otro miembro de la familia de las MKPs, MKP-2, en células de Leydig.

III.2. PAPEL FUNCIONAL DE LAS FOSFATASAS DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS PRODUCTORAS DE ESTEROIDES

III.2.1. Participación de PTPs en la regulación de la esteroideogénesis

Han y Rubin demostraron que ACTH dispara la desfosforilación de la paxilina, una proteína que participa en los arreglos del citoesqueleto (216). ACTH produce el mismo efecto en células adrenales bovinas (217) y en ZF de adrenal de rata (218). Estos hallazgos condujeron a 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 (224). La relación existente entre la arquitectura del citoesqueleto y la estimulación hormonal de la esteroideogénesis ha sido tema de intenso debate. 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 ese tema.

En 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 (224, 225). En células de Leydig de rata (226) como células Y1 (227) los agentes antimicrotubulares estimulan la esteroideogénesis basal pero inhiben la esteroideogénesis inducida hormonalmente. Se postula que el incremento en la esteroideogénesis basal observado en células Y1 expuestas a estos agentes podría deberse a los efectos de disrupción que producen los mismos sobre las membranas mitocondriales, lo cual facilitaría el transporte del colesterol al P450_{scc} (231). La inhibición sobre la esteroideogénesis estimulada hormonalmente podría deberse a la inhibición de la internalización del

colesterol de la membrana plasmática o proveniente de lipoproteínas por los agentes antimicrotubulares (228).

Los trabajos mencionados ponen en evidencia que la participación de los diferentes componentes del citoesqueleto en la estimulación hormonal aguda de la esteroidogénesis aún no se ha resuelto. Por lo tanto no se puede inferir si la desfosforilación de la paxilina por las PTPs activadas por LH/ACTH altera la magnitud de la respuesta esteroidogénica 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. Se demostró que inhibidores de PTPs que atraviesan las membranas celulares 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. A partir de estos hallazgos se postuló 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 (218, 229).

El hecho que la inhibición de la actividad de tirosina fosfatasa impide la acción hormonal sobre la producción de esteroides sugiere que las PTPs participan en la inducción de StAR. Con el fin de analizar esta hipótesis se evaluó la expresión de StAR en presencia y ausencia de inhibidores de PTPs. 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 (214, 219). Estos hallazgos permitieron concluir 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.

La enzima Acot2, una acilCoA tioesterasa aislada y caracterizada en nuestro laboratorio (230-232) actúa conjuntamente con la acil-CoA sintetasa 4 (Acsl4) (232) para regular los niveles intracelulares de ácido araquidónico, el cual modula el paso limitante en la esteroidogénesis por su acción sobre la inducción de StAR. Se demostró que la inhibición de tirosina fosfatasas bloquea la inducción por AMPc de Acsl4 y de StAR y que este efecto puede ser revertido por el agregado de ácido araquidónico (233). Dado que los inhibidores de tirosina fosfatasa impiden la inducción de Acsl4, se postuló que la actividad de una tirosina fosfatasa modularía la expresión de Acsl4 para promover la liberación de ácido araquidónico con el concomitante

incremento en la expresión de StAR. Los estudios en este tema permitieron establecer que la PTP1D es la enzima que participa -por un mecanismo aún no determinado- en la inducción de Acsl4 por LH/AMPc (234).

Como se deduce de lo expuesto en este punto, la activación de PTPs es un evento de la regulación hormonal aguda. La actividad de estas enzimas es necesaria para que las hormonas esteroideas promuevan la expresión de StAR y la síntesis de esteroides. Por lo tanto a este tipo de fosfatasa se les adjudica un rol en el “encendido” del proceso esteroideogénico.

III.2.2. Participación de MKP-1 en la regulación de la esteroideogénesis

Los hallazgos en cuanto a la regulación de MKP-1 en células esteroideogénicas promovieron el análisis del papel funcional de esta enzima en ese tipo celular. Uno de los primeros trabajos en ese campo permitió concluir que la misma modula la expresión de una enzima de la biosíntesis de esteroides. Se demostró que MKP-1 participa en la expresión de las hidroxilasas de la familia del citocromo P450 (CYPs), enzimas 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 fosfatasa 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 de SF-1 disminuía en respuesta al estímulo hormonal. En conjunto estos resultados sugirieron que una fosfatasa de actividad dual dependiente de AMPc estaría involucrada en la regulación de la actividad del factor de transcripción SF-1 (222). El mecanismo propuesto para la acción de MKP-1 sobre la expresión de CYP17 plantea que la fosfatasa promueve la desfosforilación y activación de SF-1 para el incrementar la transcripción del gen CYP17. Esto puede ocurrir por una acción directa o indirecta de MKP-1 sobre SF-1. La acción indirecta de la fosfatasa reduciría la actividad de ERK y consecuentemente favorecería la acumulación de la forma desforilada de SF-1. Una acción directa puede involucrar la desforilación del SF-1 por la MKP-1. En este marco debe señalarse que se han atribuido acciones a las MKPs que no involucran su acción sobre MAPKs, por ejemplo hay un trabajo que demuestra la acción de MKP-1 en la desforilación de histonas (235, 236).

SF-1 participa también en la regulación transcripcional del gen del receptor de ACTH (Mc2r) (237). Se demostró que en células adrenocorticales murinas la estimulación con ACTH produce 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 aumenta rápidamente y luego disminuye significativamente a los 80 minutos de estimulación, tiempo en el cual se observa el máximo de expresión de la proteína MKP-1 (215). Cuando se analizó la cinética de fosforilación de SF-1 y de expresión de MKP-1 se vio que el tiempo de máxima expresión de MKP-1 coincide con el tiempo en el cual se registra una disminución del nivel de SF-1 fosforilado. En base a estos resultados se postuló que es necesaria la desfosforilación de SF-1 luego de la primera ronda de transcripción del gen *Mc2r* para permitir, probablemente, la participación de otros factores de transcripción sobre el promotor de dicho gen. En ese contexto, MKP-1 tendría un rol modulador sobre la transcripción promoviendo la desfosforilación del SF-1 (215).

Aún cuando existe consenso en considerar que los sustratos de las MKPs son exclusivamente las MAPKs, unos pocos trabajos apuntan a una acción de MKP-1 en la desfosforilación de sustratos que no son MAPKs (235). En el marco de los trabajos comentados en los párrafos anteriores, SF-1 fosforilado podría ser sustrato directo de MKP-1. Sin embargo, Sewer y Waterman propusieron que la desfosforilación de SF-1 necesaria para la expresión de *CYP17* puede ser consecuencia de la acción de MKP-1 sobre ERK1/2. Por lo tanto, a medida que transcurre el tiempo desde que se inicia la inducción de MKP-1 con la consiguiente inactivación de ERK1/2, el grado de fosforilación de SF-1 disminuirá. Un mecanismo similar puede dar cuenta de la desfosforilación de SF-1 que acompaña la regulación de la transcripción de *Mc2r*.

Además de participar en la expresión de genes como *CYP17* y *Mc2r*, SF-1 participa en la expresión del gen *STARD1*, que codifica para la proteína StAR. Se ha demostrado que en la activación de *STARD1* participa SF-1 en su forma fosforilada y que esta fosforilación es mediada por ERK1/2 (192). En ese contexto, una disminución en la actividad de ERK1/2 –por ejemplo frente a la inducción de MKP-1– reduciría la fosforilación de SF-1 lo cual se traduciría en una menor transcripción de *STARD1*. En virtud de la fuerte regulación de MKP-1 en células de Leydig por acción de hCG/AMPc (221), se indagó si la expresión de esta fosfatasa modulaba la expresión de *STARD1*. Estos estudios mostraron que la sobreexpresión de MKP-1 reduce el efecto de AMPc sobre la fosforilación de ERK1/2, la actividad del promotor de *STARD1*, los niveles de su ARNm y la esteroidogénesis mientras que la expresión de un shARN específico produce el efecto opuesto sobre estos mismos parámetros (221).

En síntesis, los antecedentes presentados en esta sección muestran que la acción de MKP-1 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. Atendiendo a la alta homología entre MKP-1 y MKP-2, en el aspecto estructural, regulatorio y funcional, sería plausible que en células esteroidogénicas

parte de la desfosforilación de las MAPKs que ocurre luego del estímulo con hCG/AMPC ocurra por la acción de MKP-2. Precisamente este trabajo de tesis se focaliza en el estudio de la regulación y función de MKP-2 en células de Leydig.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las MKPs controlan, en acción conjunta con las MAPKKs, el grado de actividad y el tiempo de acción de las MAPKs. Este papel importante de las MKPs es de reconocimiento relativamente reciente. Nuestro grupo ha estudiado la regulación de MKP-1 en células productoras de esteroides y ha demostrado que las hormonas esteroideogénicas como ACTH y LH/hCG regulan de manera estricta la expresión de MKP-1. Más aún, de estos trabajos surge que MKP-1 modula la inducción de una proteína clave en el proceso esteroideogénico, StAR, la cual forma parte del repertorio de proteínas que se inducen/activan rápidamente por acción hormonal, por lo tanto consideradas como proteínas de la fase aguda de la regulación de la esteroideogénesis.

Existe consenso en considerar que MKP-2 se induce –en general- por los mismos estímulos que disparan la inducción de MKP-1. Por lo tanto, *podría especularse que en células de Leydig la activación del receptor de LH promueva la inducción de MKP-2*. Por otra parte, dada la similitud entre la secuencia aminoacídica de MKP-1 y MKP-2, *sería esperable que mecanismos post-traduccionales similares a los que operan en la regulación de MKP-1 también operen el control de los niveles de MKP-2*.

Nuestro grupo describió que en células de Leydig, LH/hCG regula la localización subcelular de MKP-1. Atendiendo a la homología de secuencia entre las dos fosfatasas, en particular las secuencias NLS1 y NLS2 relacionadas con la localización nuclear de MKP-1 y MKP-2 son idénticas, *es posible que la localización subcelular de MKP-2 también sea un evento dependiente del estímulo*.

Brion y col. (221) demostraron que MKP-1, producto de un gen de inducción temprana (236), disminuye los efectos de hCG y AMPc sobre la inducción del gen STARD1 que se induce rápidamente por acción de estos estímulos. Por lo tanto, en el caso en que la activación del receptor de LH promoviera la inducción de MKP-2, parece difícil que MKP-2 tenga un papel relevante en la expresión de proteínas que se inducen mucho antes que MKP-2, como ocurre con la proteína StAR, producto del gen STARD1. Más bien *MKP-2 podría tener un rol modulador similar a MKP-1 pero actuando sobre la expresión de proteínas de fase crónica de regulación hormonal*.

Aún cuando en los últimos años se ha avanzado mucho en la caracterización de MKPs, debe mencionarse que - al menos hasta la época de inicio de este trabajo- la información alcanzada respecto a MKP-2 es limitada, sobre todo si se compara con el conocimiento alcanzado con respecto a MKP-1. Basándonos en esta consideración, y con el propósito de contribuir al conocimiento de MKP-2 proponemos como objetivo

general para este trabajo **analizar la regulación hormonal de MKP-2 en células de Leydig y establecer su papel funcional en este tipo celular.**

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- 1) Analizar si LH regula MKP-2 a nivel transcripcional en células de Leydig MA-10**
- 2) Analizar si LH regula MKP-2 a nivel post-traducciona y establecer el mecanismo que opera en esta eventual regulación**
- 3) Estudiar si la localización subcelular de MKP-2 está ligada a la estimulación hormonal de las células.**
- 4) Establecer si MKP-2 es capaz de modular la expresión del gen CYP11A1, el cual forma parte de los genes regulados en la etapa crónica de la acción de las hormonas esteroidegénicas y cuya expresión es necesaria para síntesis de todas las hormonas esteroideas.**

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES Y MÉTODOS

I.1. REACTIVOS UTILIZADOS

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): medio de cultivo Waymouth MB732, anticuerpo anti-flag, 8-Br-adenosina 3',5'- monofosfato cíclico (8Br-AMPC), seroalbúmina bovina (BSA), oligonucleótidos oligo (dT), estándares de peso molecular para electroforesis, HEPES (ácido 4-(2-hydroxyetil)-1-piperazineetanesulfónico), 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), TemedTM.

Las enzimas de restricción, transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), Go Taq ADN polimerasa y T7 RNA polimerasa, y dNTPs, inhibidor de ribonucleasas RNAsin®, y otros 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 fue provisto por Corning-Costar (NY, USA). Los siguientes reactivos: tripsina, antibióticos, suero equino y TRizol® fueron provistos por Gibco-Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA).

Los anticuerpos utilizados fueron del siguiente origen: el anticuerpo policlonal anti- MKP-2, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, USA); anticuerpos contra pERK1/2, ERK1/2, pJNK 1/2 y anti histona H2B, Cell Signaling (Beverly, MA, USA); el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina, Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA); los anticuerpos anti-IgG de ratón y de conejo desarrollados en cabra y conjugados con peroxidasa, 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 Laboratorios y el equipo de electroforesis para geles de agarosa Gel XL ultra V-2 por Labnet International (Edison, NJ, USA). La membrana HybondTM-N+ para transferencia de ácidos nucleicos y el reactivo de detección de *western blot* por quimioluminiscencia (ECL advance) se adquirieron en GE Argentina (Buenos Aires, Argentina). Otro reactivo quimioluminisciente (Bio-Lumina) fue adquirido a Productos Bio-Lógicos® (UNQ, Bernal, Pcia. de Buenos Aires, Argentina)

I.2. PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes: pGL3-StAR, gentilmente cedido por Dr. Colin Jefcoate, Department of Pharmacology, University of Wisconsin-Madison Medical School, Madison, Wisconsin, USA, (238); pGL3-CYP11A1 gentilmente cedido por Dr. Bon-Chu Chung, Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan, republica de China, (239).

El plásmido pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 8) fue utilizado para clonar los productos amplificados en las reacciones de PCR como se explicará a continuación.

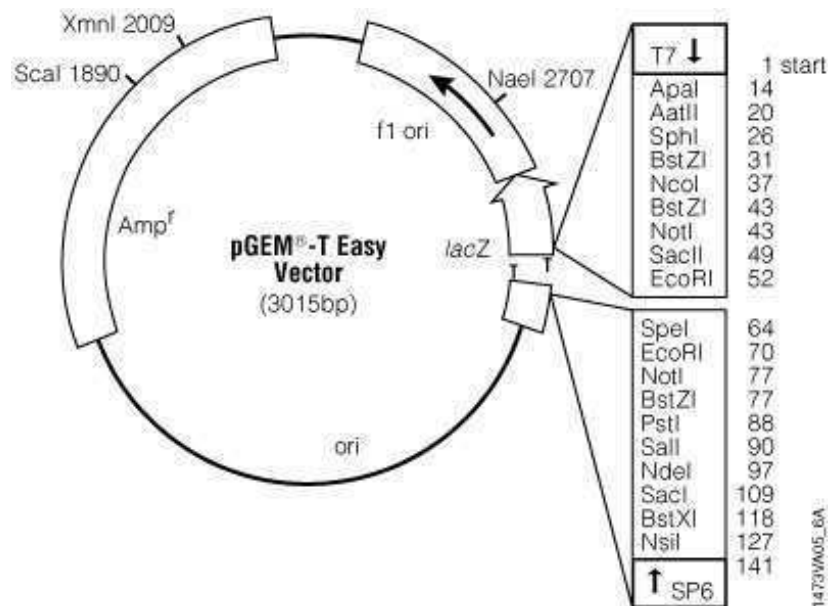


Figura 8: Mapa del plásmido comercial pGEM®-T Easy.

El plásmido p3XFLAG-CMV-10 (Sigma) (Figura 9), se utilizó para estudios de sobre-expresión de proteínas fusionadas a una secuencia específica de aminoácidos (flag) que permite su identificación una vez expresada en células eucariotas mediante un anticuerpo comercial anti-flag.

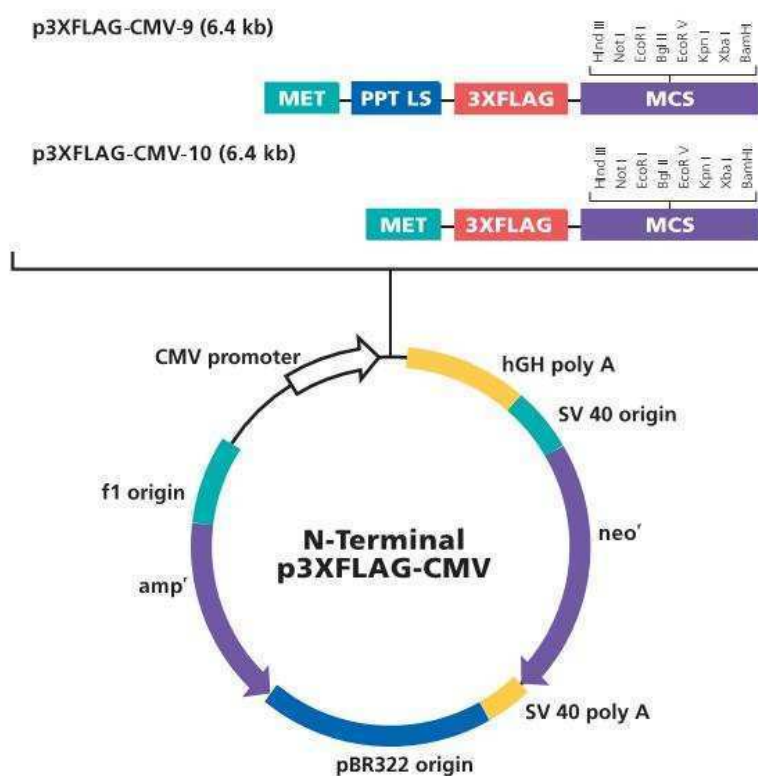


Figura 9: Mapa del plásmido comercial p3XFLAG-CMV™-10

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

I.3. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

I.3.1. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN se analizaron en 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 (Tris 0,4 mM, ácido acético glacial 11,14 % v/v, EDTA 2,5 µM). 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).

I.3.2. Purificación de fragmentos de ADN

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. Al tubo conteniendo la porción del gel de agarosa, se adicionaron 10 µl de solución llamada “*membrane binding solution*” (isotiocianato de guanidina 4,5 M, acetato de potasio pH 5,0, 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. Luego se centrifugó durante 1 minuto a 16.000xg y se descartó el eluido mientras que el ADN quedó adherido a la sílica. Se lavó la columna con 700 µl de solución de lavado (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 500 µl 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.

I.3.3. Ligación en el plásmido pGEM®-T Easy

Los fragmentos de ADN purificados luego de la elución del gel se ligaron al plásmido pGEM®-T Easy para su posterior secuenciación y análisis. Se colocó 1 µl 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 µl (50 ng) del vector, la cantidad correspondiente del fragmento de ADN a ligar en relación 3:1 (inserto:vector) y 1 µl de ADN ligasa de T4 (3U) y H₂O en un volumen final de 10 µl. Se dejó transcurrir la reacción durante toda la noche a 4°C. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-Blue.

I.3.4. Digestión con endonucleasas de restricción

El protocolo sugerido por el fabricante consistió en digerir 1 µg de ADN con 5 U de la enzima de restricción apropiada en una mezcla de reacción conteniendo 2 µl de solución amortiguadora 10x (adecuada para cada enzima), BSA acetilada 2 µg/µl y H₂O hasta un volumen final de 20 µl. La incubación fue realizada durante 1,5 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.

I.3.5. Desfosforilación de vectores y reacción de ligación

A los 20 µl del producto de la reacción de digestión con endonucleasas se le adicionaron 26 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera en una solución amortiguadora alcanzando un volumen de reacción de 40 µl de volumen final. Se dejó transcurrir la reacción de desfosforilación durante 20 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por incubación a 65°C durante 15 minutos. A continuación el producto fue purificado con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

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

I.4. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Y AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

1.4.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo de bacterias

Se utilizó en los subclonados la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue de Stratagene Labs Systems (La Jolla, CA, USA). Su genotipo es: endA1, gyrA96, hsdR17, lac⁻, recA1, relA1, supE44, thi-1, [F' lacIqZ _ M15, proAB, Tn10].

Estas bacterias se cultivaron en el medio Luria-Bertani (LB) cuya composición incluye 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 agregó agar hasta alcanzar una concentración de 15 g/litro.

1.4.2. 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, alícuotas de 100 µl del cultivo de bacterias se diluyeron en 10 ml de medio LB fresco. La solución 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 3500 xg 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 con el

agregado de glicerol (25%). A continuación la suspensión se fraccionó en alícuotas de 200 µl y las alícuotas se conservaron a -70°C.

I.4.3. 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.

Una alícuota de 200 µl de bacterias competentes fue descongelada de manera lenta en un baño de hielo/H₂O por 30 minutos. Luego se agregó 10 µl de la solución de ADN plasmídico (0,1 µg) a la mezclando con pipeta para homogeneizar la mezcla.

Se dejó estabilizar en hielo 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 adicionó a la mezcla 500 µl de medio LB fresco (sin antibióticos) y se incubó a 37°C durante 60 minutos con agitación para lograr la recuperación de las células. Finalmente se centrifugó el sistema a 3500 xg durante 3 minutos a temperatura ambiente y las bacterias sedimentadas se sembraron en placas conteniendo LB agar con ampicilina. Las placas fueron incubadas en estufa toda la noche a 37°C.

I.4.4. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico en pequeña escala (MINIPREP)

Para el aislamiento y purificación de ADN plasmídico en pequeña escala se utilizó el sistema Wizard® (Promega) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Con este fin las colonias bacterianas transformadas seleccionadas se inocularon en 5 ml de LB con ampicilina y se incubaron durante la noche a 37°C con agitación continua. 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/µl. Seguidamente 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 10.000 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, retenido en la columna, 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 10.000xg 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.

I.4.5. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico en mediana escala (MIDIPREP)

Para el aislamiento y purificación de ADN plasmídico en mediana escala se utilizó el sistema Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. 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. 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 14.000 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%. Luego se secó la resina por aplicación de vacío por 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 para eliminar los restos de solución de lavado. 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 10.000xg durante 20 segundos.

I.5. LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio la línea de células de Leydig de origen murino MA-10. Es una línea celular ampliamente caracterizada cuyo origen fue un tumor trasplantable murino de células de Leydig, M5480P (166). Fue generosamente cedida por el Dr. 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 y conservan los mismos pasos regulatorios que las células de Leydig excepto que producen progesterona (P4) como esteroide principal en lugar de testosterona.

I.6. ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO

Las células MA-10 fueron sembradas a una densidad de aproximadamente 4×10^5 células/pocillo cuando se utilizaron placas de cultivo de 6 pocillos, o 1×10^5 células/pocillo cuando se usaron placas de 24 pocillos, y se crecieron en estufa a 36°C , gaseada con 5% de CO_2 . Las células fueron arrastradas 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 células se realizó por incubación en medio libre de suero en ausencia o presencia de hCG u 8Br-AMPC, según lo indicado en cada experimento. El tiempo de estimulación se indica en la descripción de cada experimento en particular.

Al finalizar los tratamientos, los medios de cultivo fueron recolectados para cuantificar el contenido de progesterona (P4) por radioinmunoanálisis (RIA). La monocapa de células se lavó con PBS pH 7,4 (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,47 mM) y luego se procesó para obtener las proteínas celulares o el ARNm, de acuerdo al estudio a realizar.

I.7. TRAMIENTO DE LAS CÉLULAS PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

1.7.1. Obtención de lisados celulares

Luego de los diferentes tratamientos, las células se lavaron como se indicó en el párrafo anterior y luego se procesaron para obtener los lisados celulares o para realizar el fraccionamiento subcelular. La lisis se realizó agregando una alícuota de 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 fosfatasa (leupeptina 10 μM , pepstatina A 1 μM , PMSF 1 mM, Na_3VO_4 200 μM , NaF 50 mM y β -glicerol fosfato 40 mM).

Las células fueron removidas con una espátula apropiada, y la suspensión obtenida se centrifugó a 1500 xg durante 10 minutos. Una alícuota de la muestra obtenida se usó para cuantificar las proteínas, el resto del material se usó inmediatamente o se conservó a -70°C .

1.7.2. Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular se realizó mediante centrifugación diferencial. Brevemente, las células MA-10 fueron lavadas con PBS y cosechadas en una solución amortiguadora (Buffer A) conteniendo: sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, HEPES-KOH

pH 7.4 20 mM, KCl 10 mM y MgCl₂ 1.5 mM, mas inhibidores de fosfatasas y proteasas en la proporción que fue descrita en el apartado de obtención de lisados celulares. Luego fueron homogeneizadas con un homogenizador manual (Pellet pestle motor homogeniser, Kontes) en hielo. Los homogenatos resultantes celulares fueron filtrados con un filtro PES-77 (Polynom, Suiza), para eliminar restos celulares y luego centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos. El sedimento (rico en núcleos) fue resuspendido con 150 µl de buffer A y centrifugado nuevamente a 1.000 x g por 10 minutos. El sedimento obtenido, correspondiente a la fracción nuclear, se resuspendió en 50 µl de buffer A y se sonicó con tres pulsos de 15 segundos cada.

El sobrenadante de la centrifugación anterior fue centrifugado a 15.000 x g por 15 minutos. En el sedimento de este paso se colectan organelas como mitocondrias, lisosomas, golgi y fracción microsomal mientras que el sobrenadante contiene las proteínas citoplasmáticas.

I.8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

I.8.1. Determinación de proteínas por el método de Bradford

La concentración de proteínas en las muestras fue determinada siguiendo el método descrito por Bradford (240), usando albúmina sérica bovina como proteína patrón.

I.8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las proteínas provenientes de lisados celulares totales o de fracciones celulares separadas por centrifugación diferencial (20-25 µg) fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE). Se realizaron geles de poliacrilamida entre placas de vidrio, utilizando el sistema MiniProtean III System de BioRad. El gel separador se preparó con una solución de 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.

I.8.3. 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 membranas 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 o TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) 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 dirigido contra la proteína a detectar.

Al otro día 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, ratón o cabra conjugado con peroxidada, en una dilución adecuada (1/3.000-1/20.000) en TTBS. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y un último lavado con TBS. Por último, la señal fue detectada por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL y autorradiografía.

I.9. ANÁLISIS DEL ARN Y ADN

I.9.1. Extracción de ARN total

Para la obtención de ARN total se utilizó el reactivo *TRIZOL*TM y se siguió 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 a las muestras, la cantidad agregada responde a la siguiente proporción: 0,24 ml de cloroformo por cada ml de *TRIZOL*TM utilizado en el paso anterior. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 30 segundos y luego se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se aisló la fase

acuosa, se le agregó alcohol isopropílico (siguiendo la proporción 0,5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de *TRIZOL*TM utilizado en el primer paso) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12.000 x g a 4°C para precipitar el ARN. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el ARN precipitado se lavó con etanol 75% (siguiendo la proporción 1 ml de etanol 75% por cada ml de *TRIZOL*TM utilizado en el primer paso). 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 a 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.

I.9.2. Transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

I.9.2.a. Reacción de transcripción reversa (RT)

Para la reacción de transcripción reversa (RT) se utilizó la enzima 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 plantados de ARNm largos (>5kb).

Para realizar la RT de los ARNm se utilizaron 2 µg de ARN total y 1 µg de oligonucleótidos al azar (*random*), en un volumen de 15 µl con H₂O tratada con DEPC. La mezcla fue incubada 5 minutos a 72°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 MMLV RT, 1,25 mM de cada dNTP, 25 unidades del inhibidor de RNAsas 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. Finalizada la reacción, alícuotas de 1-2 µl del ADNc obtenido se utilizaron en reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos.

I.9.2.b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

-Amplificación de ADNc de MKP-2 a partir de ADNc de ratón

La reacción de amplificación del ADN se llevó a cabo en una solución amortiguadora conteniendo Tris/HCl 20 mM pH 8.8, KCl 10 mM, MgSO₄ 2 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Triton X-100 0,1 %, BSA libre de nucleasas 0,1 mg/ml, 200µ M de cada uno de los dNTPs, 50 pmoles de cada oligonucleótido, 3 unidades de *Pfu* ADN

polimerasa (con actividad de corrección de errores) y 0,1 µg de ADN templado. El volumen final de reacción es de 25 µl.

A partir del ADNc de MKP-2 de ratón (NM_176933.4) se amplificó un fragmento de 1,294 kb (nucleótidos 86 a 1382) con el fin de generar el vector de expresión pFLAG-MKP-2. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR se describen en la tabla 1 y las condiciones de amplificación fueron: 1) 2 minutos a 95°C, 2) 30 segundos a 95°C, 3) 30 segundos 54°C, 4) 3 minutos a 72°C y 5) 5 minutos a 72°C, con una repetición de 33 ciclos desde el segundo hasta el cuarto paso. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y luego se purificó el ADNc a partir del gel en la forma que se describió anteriormente. El fragmento de interés fue clonado en el vector pGEM®-T Easy obteniendo la construcción MKP2- pGEM®-T Easy.

Oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)	Tm	Amplición	Nro de Ciclos
mMKP-2 F	CTAGCTCCCCAGCTTACTGC	51,1	1294 pb	33
mMKP-2 R	TGCTGTTCACAGGTGGCTGG	56,8		

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para amplificar el ADNc de MKP-2 de ratón. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y las correspondientes temperaturas de *melting* o Tm. Se indica el tamaño del fragmento que amplifican (amplición) y el número de ciclos utilizados para la reacción de PCR.

-Amplificación de ADNc de MKP-2 a partir de MKP2- pGEM®-T Easy

Luego se utilizó el plásmido MKP2- pGEM®-T Easy conteniendo la secuencia de 1,294 kb de MKP-2 como templado de una PCR con oligonucleótidos específicos y que contienen la secuencia de corte de las enzimas de restricción *Not I* (en el oligonucleótido con orientación sentido) y *Bam HI* (en el oligonucleótido con orientación antisentido). Esta estrategia permite generar un plásmido con sitios de corte apropiados para clonar en el vector p3XFLAG-CMV-10. Se optó por incorporar sitios de corte para esas enzimas específicamente porque sus sitios de corte no se encuentran en la secuencia de MKP-2 pero si están presentes en el sitio múltiple de clonado de p3XFLAG-CMV-10.

La PCR se llevó adelante con mismo método estándar descrito anteriormente para la obtención del fragmento a clonar en el vector pGEM®-T Easy.

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR se describen en la tabla 2 y las condiciones de amplificación se describen a continuación: a) 2 minutos a 95°C, b) 50 segundos a 95 °C, c) 30 segundos 68,5 °C, d) 2,5 minutos a 72 °C y e) 5 minutos a 72 °C, con una repetición de 35 ciclos desde el segundo hasta el cuarto paso.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, luego se purificó el ADN a partir del gel en la forma que se describió anteriormente. Los fragmentos de interés fueron clonados en p3XFLAG-CMV-10 con las enzimas *Not I* y *Bam HI*.

Oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)	Tm	Amplición	Nro de Ciclos
MKP-2 (FLAG) F	TTGCGGCCGCTATGGTGACGATGGAG	68,9	1262 pb	35
MKP-2 (FLAG) R	AAGGATCCTGCTGTTCACAGGTGGCTGG	68,4		

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para amplificar el ADNc de MKP-2 a partir de MKP2-pGEM®-T Easy. Se muestran sus secuencias y las correspondientes Tm. Se indica el tamaño del fragmento que amplifican (amplición) y el número de ciclos utilizados para la reacción de PCR.

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

Se evaluaron los niveles del ARNm de MKP-2 por RT-PCR semicuantitativas. Se amplificó un fragmento de 600 pb correspondiente al ARNm de MKP-2 mediante 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 fue optimizado para cada ADNc. 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 las señales en función del número de ciclos en un gráfico semi-logarítmico. Los ciclos elegidos para las posteriores amplificaciones se encontraban en la región lineal de esta curva.

Para comparar las cantidades de ADN en las distintas muestras, éstas se normalizaron respecto de las cantidades en cada muestra de un ADN que sirve como control de carga. Con esta finalizada se analizó la expresión del ARNm correspondiente

a la proteína ribosomal L19. 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) 2 minutos a 95 °C, b) 45 segundos a 95 °C, c) 1 minuto a 54 °C, d) 40 segundos a 72 °C y e) 5 minutos a 72 °C, con una repetición de 19, 25, 30, 35, 40 y 45 ciclos desde el segundo hasta el cuarto paso. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada transcrito se muestran en la tabla 3. Finalmente se determinó que el número de ciclos óptimo para el transcrito de MKP-2 fue de 25 ciclos y de 23 para el correspondiente a L19.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm	Amplicón	Nro de Ciclos
MKP-2 directo	CTGTACCTCCCAGCACCAAT	51,4	600 pb	25
MKP-2 reverso	ACAGGGAAGCTGAAGACGAA	51,4		
L19 directo	GAAATCGCCATTGCCAACTC	54,5	505 pb	23
L19 reverso	TCTTAGACCTGCGAGCCTCA	52,6		

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR semicuantitativa. Se muestran sus secuencias y las Tm. Para cada par de oligonucleótidos se indica el tamaño del fragmento que amplifican (amplicón). Luego se determinó que el número de ciclos óptimo para el transcrito de MKP-2 fue de 25 ciclos y de 23 para el correspondiente a L19.

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

El ANDc de los genes que codifican para MKP-2, CYP11A1 (NM_019779) y 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 quipo ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Los oligonucleótidos (5'-3') directos y reversos utilizados se muestran en la tabla 4.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	T _m	Amplicón
MKP-2 directo	GCCTACCTGATGAAGAAGCG	50,6	153 pb
MKP-2 reverso	TGGTGAGCACCTGAGACTCA	51,4	
CyP11A1 directo	GTGCCTCCAGACTTCTTTTCG	53,3	173 pb
CyP11A1 reverso	TTCTTGAAGGGCAGCTTGTT	51,7	
GAPDH directo	TGCACCACCAACTGCTTAGC	53,7	408 pb
GAPDH reverso	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	55	

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real. Se muestran sus secuencias y las T_m correspondientes. Para cada par de oligonucleótidos se indica el tamaño del fragmento que amplifican (amplicón).

Se utilizó a una concentración de 0,3 μ M de cada nucleótido en cada reacción. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Paso 1: 10 minutos a 95°C, Paso 2: 15 segundos a 95°C, Paso 3: 60 segundos a 60 °C para CYP11A1 y GAPDH o 51 °C para MKP2, con una repetición de 40 ciclos desde el segundo hasta el tercer 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. La cuantificación relativa de la expresión génica fue calculada usando curvas estándar y normalizando con GAPDH. Para adquirir las diferencias cuantitativas en el ADN copia blanco entre muestras, se aplicó el modelo matemático de Pfaffl (241). Para cada muestra se determinó una proporción de expresión calculando $(E_{\text{blanco}})^{\Delta C_t(\text{blanco})} / (E_{\text{GAPDH}})^{\Delta C_t(\text{GAPDH})}$, donde E es la eficiencia del par de primers y $\Delta C_t = C_t \text{ ADN copia de normalización} - C_t \text{ ADN copia experimental}$. La eficiencia de amplificación de cada par de primers fue calculada desde la curva de amplificación estándar del log (ng cDNA) por reacción vs. el valor C_t ($E = 10^{-(1/\text{pendiente})}$). Las eficiencias 2.0 ± 0.1 fueron consideradas óptimas.

I.10. OBTENCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN *p3XFLAG-MKP-2*

El cDNA de MKP-2, que contenía las secuencias consenso de corte para las enzimas de restricción *Not I* y *Bam HI* en sus extremos, se amplificó a partir de la construcción MKP2- pGEM®-T Easy y se clonó en el plásmido de expresión p3XFLAG-CMV-10.

El clonado del fragmento se realizó en el mismo marco de lectura que el péptido de reconocimiento flag, el cual está ubicado en el extremo 5' del vector. De esta manera se genera una proteína de fusión flag-MKP-2 con el flag en el extremo N-terminal. La proteína recombinante puede ser detectada por Western blot con un anticuerpo anti-flag (Sigma).

Se digirió 1 µg de plásmido p3XFLAG-CMV-10 con las enzimas *Not I* y *Bam HI* de manera de crear extremos compatibles con el fragmento correspondiente al ADNc de MKP-2 que se obtuvo y purificó del gel como se explicó anteriormente. La digestión del plásmido se realizó durante 3 horas a 37°C. El producto de la digestión fue analizado en un gel de agarosa con bromuro de etidio. Luego se desfosforilaron sus extremos para evitar su recircularización. Posteriormente se ligó el ADNc de MKP-2 y el plásmido desfosforilado, manteniendo una relación molar inserto:vector de 3:1. La reacción de ligación se realizó en agitación continua durante toda la noche a 15°C. 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.

I.11. OBTENCIÓN DE UN VECTOR DE EXPRESIÓN DE ARNs PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA DE MKP-2

Una estrategia utilizada para disminuir específicamente los niveles de la proteína MKP-2 fue la transfección de las células con una construcción que permite la expresión de un ARN pequeño llamado *shARN* (*short hairpin*) bajo el control del promotor de la ARN H1 polimerasa III, el cual interfiere con la acumulación del ARNm de MKP-2. Este tipo de construcción contiene una secuencia específica para cada ARNm, MKP-2 en nuestro caso; inserto en el plásmido pSUPER.retro (OligoEngine).

Con el fin de preparar el plásmido MKP-2-pSUPER.retro primeramente se diseñaron oligonucleótidos que contienen una porción de secuencia específica al ARNm de MKP-2 de 19 pb de longitud (Tabla 5). Cada oligonucleótido presenta las siguientes características: un sitio de corte para una enzima de restricción (*BglII* o *HindIII*), una secuencia correspondiente a una región del ARNm cuya expresión se quiere inhibir (en orientación sentido), 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 (*short hairpin*).

Una vez obtenido el par de oligonucleótidos (sentido y antisentido), éstos fueron hibridados entre sí y luego se clonaron en el vector pSUPER.retro en los sitios de restricción de las enzimas *Bgl*II y *Hind*III. Se realizó el corte del vector pSUPER.retro con las enzimas mencionadas, el vector linealizado se purificó a partir de un gel de agarosa y se usó para clonar el fragmento de oligonucleótidos hibridados bajo el control del promotor de la ARN polimerasa III y generar la construcción pSUPER.retro-MKP-2 (*sh*ARN-MKP-2). El transcripto resultante del vector se repliega conformando una estructura de bucle, la cual es rápidamente clivada en la célula produciendo de esta manera el *sh*ARN funcional. La transfección de las células con esta construcción lleva a la degradación específica del ARNm de MKP-2. La construcción obtenida fue verificada por digestión con enzimas de restricción y mediante secuenciación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición en el ARNm de MKP-2
shARN1F	GATCCCCAGGTGGCTATGAGAGGTTTTCAAGAG AAAACCTTCATAGCCACCTTTTTTA	563-581
shARN1R	AGCTTAAAAAAGGTGGCTATGAGAGGTTTTCTCTT GAAAACCTTCATAGCCACCTGGG	
shARN2F	GATCCCCAAGACTGTCCCAATCACTTTTTCAAGA GAAAAGTGATTGGGACAGTCTTTTTTA	821-839
shARN2R	AGCTTAAAAAAGACTGTCCCAATCACTTTTTCTCTT GAAAAGTGATTGGGACAGTCTGGG	
Scr1F	GATCCCCATCACAAGTTTGCTCCCGTTCAAGAG CCGGGAGCAAAGTTGTGATTTTTTA	---
Scr2R	GATCCCCAAGTTCTCCCACTGATTCATTCAAGAG ATGAATCAGTGGGAGAACTTTTTTTA	---

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados para generar los *sh*ARNs específicos de MKP-2 de ratón y sus correspondientes plásmidos control o Scr. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y su posición en el ARNm de MKP-2 (en el caso de los plásmidos que portan secuencias específicas). En negrita se remarcan las secuencias sentido y antisentido involucradas en la formación del bucle.

I.12. MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA

Con el fin de obtener la mutante puntual S319A-MKP-2, se realizó una reacción de mutación sitio-dirigida utilizando el kit Stratagene QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit.

Para generar la mutación se realizó la replicación del plásmido p3XFLAG-MKP-2 guiada por 1 par de oligonucleótidos mutagénicos especialmente diseñados utilizando la polimerasa *Pfu Ultra* de alta fidelidad. Estos oligonucleótidos presentan el cambio de base necesario en el codón de la secuencia de MKP-2 de manera de cambiar la Serina 319 por Alanina (S319A). Se verificó la mutación en la construcción obtenida, flag-MKP-2 S319A, mediante secuenciación. Los oligonucleótidos (5'-3') directos y reversos utilizados se muestran en la tabla 6.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Codón original	Aminoácido original	Aminoácido nuevo
S319A-MKP-2 F	GTCAAGCAGCGCCGAG GCCA TCATCTCGCCCAAC	AGC	SERINA/S (Posición 319)	ALANINA/A (Posición 319)
S319A-MKP-2 R	CAGTTCGTGCGGGCT CGGT AGTAGAGCGGGTTG			

Tabla 6: Oligonucleótidos utilizados para generar la mutante de MKP-2 de ratón. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos, el codón original y el aminoácido original y nuevo y se indica la posición del aminoácido cambiado en la secuencia aminoacídica de MKP-2. En negrita se remarcan las bases correspondientes al codón de interés modificado.

I.13. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las células fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia en placas de 24 pocillos. La transfección fue realizada con 0,8 µg de plásmido en medio Opti-MEM y 2 µl de reactivo Lipofectamina™ 2000 y siguiendo las instrucciones del fabricante, en 500 µl de medio sin antibióticos. Los plásmidos utilizados fueron: *shRNA* de MKP-2, p3xFLAG-MKP-2, 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 promotor del gen CYP11A1 (pGL3- CYP11A1 (239)), junto con 0,35 µg del plásmido p3xFLAG-MKP-2 o del *shRNA* de MKP-2, y 2 ng del plásmido pRL (vector control que contiene el ADNc de la luciferasa *Renilla*). 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 con 8Br-AMPC en un medio de cultivo libre de suero, para ser luego procesadas para la obtención del ARN. La eficiencia de transfección fue aproximadamente del 40%, como se estimó por conteo de células fluorescentes transfectadas con el plásmido pRc/Cmvi conteniendo la forma mejorada de la proteína fluorescente verde (EGFP).

I.14. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA

Para evaluar la actividad del promotor en estudio se evaluó la actividad de luciferasa en lisados de células transfectadas con el plásmido pGL3- CYP11A1. Las células fueron co-transfectadas con el plásmido pGL3-CYP11A1, el cual que dirige la expresión de la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor del gen CYP11A1 y el plásmido pRL (2ng), el cual contiene el gen de la enzima *Renilla* luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo, como control de la transfección. Con el fin de analizar en que grado la expresión de MKP-2 afecta la actividad de promotor del gen CYP11A1, se efectuaron también co-transfecciones incluyendo los vectores p3xFLAG-MKP-2 o *shRNA* de MKP-2. 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 regulable por los promotores específicos respecto de la actividad constitutiva de la luciferasa *Renilla* y se expresa en unidades relativas. La detección de la actividad de ambas enzimas se realizó mediante un lector multiplaca SynergyTM HT (Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments).

I.15. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA

Las células se crecieron en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, luego se lavaron una vez con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego 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-2 (anti-MKP-2), anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína flag-MKP-2 (anti-flag) o con suero preinmune (control) en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche. 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-MKP-2 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 de dos maneras distintas. Por un lado, 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). En otros casos las muestras se analizaron por microscopía confocal utilizando un microscopio confocal de escaneo por láser, Olympus FV300 (Dpto de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEyN, UBA, Argentina).

I.16. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Finalizados los tratamientos de los cultivos celulares, la 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 antiprogesteroa 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 xg 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 de centelleo líquido. Los datos se expresaron como P4 producida por volumen de medio (ng/ml).

I.17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como la media \pm SEM. La significancia estadística fue evaluada utilizando ANOVA, seguida del test de Tukey.

RESULTADOS

I. ANALISIS DE LA EXPRESION DE MKP-2 POR ACTIVACION DEL RECEPTOR DE LH EN CELULAS DE LEYDIG DE LA LINEA MA-10

I.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MKP-2 POR hCG

Trabajos previos de nuestro grupo, a los cuales se hace referencia en la introducción de este trabajo, describen que las hormonas ACTH y hCG regulan la expresión y actividad de MKP-1 en células adrenocorticales y de Leydig respectivamente (115, 221). Se ha propuesto que la acción de esta fosfatasa contribuye al “cierre” del circuito de acción de las MAP quinasa. Dada la similitud entre MKP-1 y MKP-2 en lo que se refiere a secuencia, sustratos, y regulación, postulamos que la estimulación del receptor de LH, con por ejemplo GC, podría modular también los niveles de expresión de MKP-2. Con este propósito procedimos a analizar la expresión de MKP-2 en células de Leydig de la línea MA-10. Analizamos los niveles de expresión en condiciones basales y en células estimuladas con hCG o con el segundo mensajero de la cascada de señalización que esta hormona enciende, en forma de derivado permeable, 8Br-AMPC.

Para evaluar los niveles del ARNm de MKP-2, los cultivos de células de Leydig de la línea MA-10 fueron privados de suero durante las 24 horas previas a la estimulación. Este procedimiento es habitual para analizar tanto la actividad de MAPKs como los niveles de expresión de MKPs, dado que el suero promueve la activación de las MAPKs e induce la expresión de MKPs. Luego de ese período, las células fueron incubadas en presencia o en ausencia de la hormona hCG (20 ng/ml) o de 8Br-AMPC (0,5 mM), durante distintos tiempos. A continuación, se extrajo y purificó el ARN total, el cual se utilizó para la valoración del ARNm de MKP-2. En los primeros ensayos se evaluó el nivel del ARNm de MKP-2 mediante RT-PCR semicuantitativa. Utilizando oligonucleótidos específicos se amplificó un fragmento de 560 pb correspondiente al ARNm de MKP-2. Como control de la cantidad de ARNm utilizado en cada reacción, se realizó en paralelo la amplificación del transcrito de la proteína ribosomal L19, cuyos niveles no se modifican por el tratamiento hormonal. Para validar la técnica de PCR semicuantitativa, se determinó el número óptimo de ciclos de amplificación tanto para el ARNm de MKP-2 como para el de L19. Para asegurar que esta técnica pueda ser una herramienta cuantitativa, es necesario en primera instancia identificar un número óptimo de ciclos de amplificación. Este será aquel donde la amplificación sea exponencial y por lo tanto sea posible distinguir las diferencias en la cantidad de

ARNm según el tratamiento. El número de ciclos de amplificación óptimo para el ARNm de MKP-2 fue de 27, mientras que para el ARNm de L-19 fue de 23 (Figura 10).

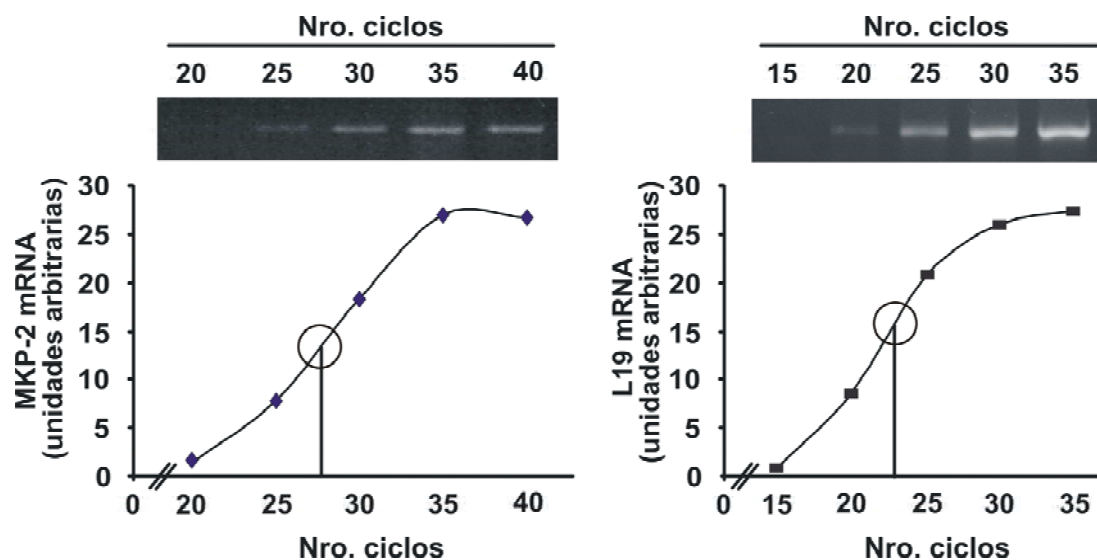


Figura 10: Determinación del número de ciclos óptimo de PCR semicuantitativa para la cuantificación de los ARNm correspondientes a MKP-2 y L19. Se extrajo el ARN total de células MA-10, se sintetizó ADNc a partir de éste por RT y se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Se ensayaron distinto número de ciclos para la amplificación por PCR del ADNc de MKP-2 y L19 (indicados 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. El grafico inferior muestra 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.

A partir de esta información en primer lugar se analizó el efecto de hCG u 8Br-AMPC sobre los niveles de ARNm de MKP-2 en células MA-10. Se observó que ambos estímulos producen un aumento transitorio en los niveles de este mensajero (Figura 11)

Con estos hallazgos promisorios, para los próximos experimentos se decidió valorar el ARNm por PCR en tiempo real. Este cambio de metodología permitiría definir con mayor precisión las variaciones cuantitativas de la expresión de MKP-2 producidas por diversos tratamientos. Utilizando oligonucleótidos específicos se amplificó un fragmento de 153 pb correspondiente al ARNm de MKP-2. Como control de la cantidad de ARN total utilizado en cada reacción, se realizó en paralelo la amplificación del transcripto de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), cuyos niveles no se modifican por el tratamiento hormonal.

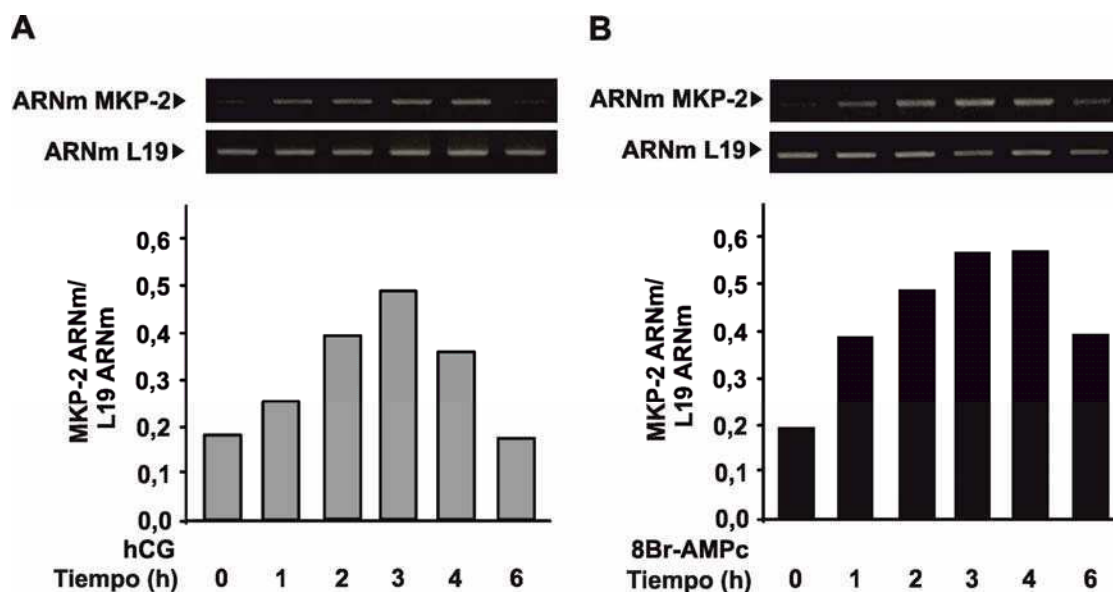


Figura 11: Cuantificación por RT-PCR de los niveles del ARN mensajero de MKP-2 en función del tiempo de estimulación con hCG u 8Br-AMPC. Las células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con hCG (20 ng/ml) **(A)** u 8Br-AMPC (0,5 mM) **(B)** durante los tiempos indicados. Se evaluó el nivel de expresión del ARNm de MKP-2 y de L19 mediante PCR semicuantitativa. En el panel superior se muestra la imagen correspondiente a un gel de agarosa representativo. El gráfico del panel inferior muestra la cuantificación de los niveles del ARNm de MKP-2, normalizados respecto a los niveles del ARNm de L19. El gráfico corresponde a la imagen de la parte superior. La figura muestra el resultado de un experimento, repetido al menos 3 veces con resultados similares.

Mediante la cuantificación de los niveles del ARNm por RT-PCR en tiempo real se determinó que la estimulación del receptor de LH (LHR) con la hormona hCG (20 ng/ml) incrementa de manera transitoria los niveles del ARNm de MKP-2. Este efecto fue estadísticamente significativo luego de 2 horas de tratamiento, alcanzando el mayor aumento entre las 2 y las 3 horas (aumento de aproximadamente 2,5 veces con respecto al control), descendiendo luego hasta alcanzar los valores basales a las 6 horas de tratamiento. El perfil cinético de la acumulación del ARNm promovido por 8Br-AMPC (0,5 mM) fue similar al obtenido por estimulación con hCG (Figura 12).

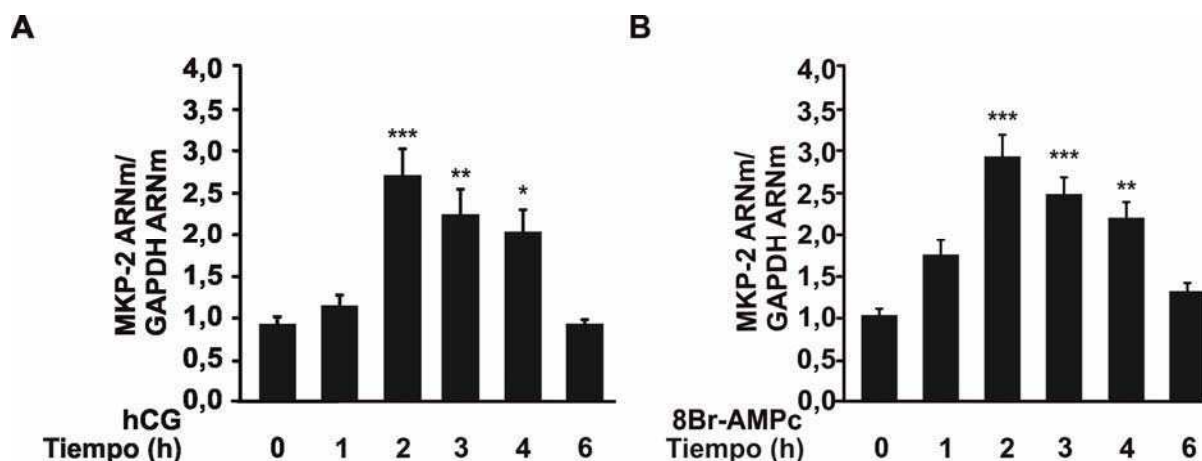


Figura 12: Efecto de hCG y 8Br-AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-2. Las células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con hCG (20 ng/ml) **(A)** u 8Br-AMPc (0,5 mM) **(B)** durante los tiempos indicados. Se evaluaron los niveles de los ARNm de MKP-2 y de GAPDH mediante PCR en tiempo real. Los niveles del ARNm de MKP-2 fueron normalizados respecto a los niveles del ARNm de GAPDH. Los datos representan el promedio \pm SEM de tres experimentos. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Analizamos además el efecto de la concentración de hCG sobre los niveles de expresión de MKP-2. Como se muestra a continuación (Figura 13), la concentración mínima de hormona que produce un incremento significativo fue 5 ng/ml.

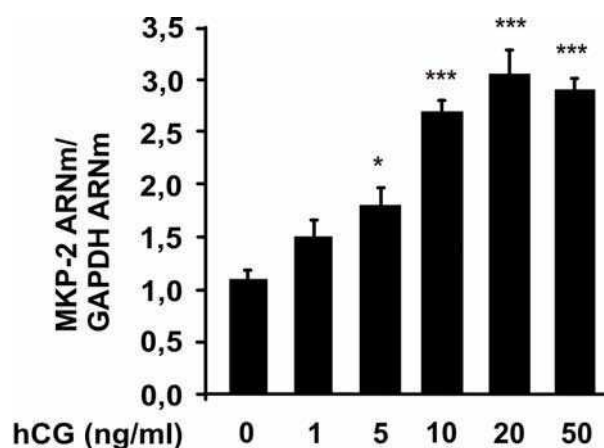


Figura 13. Efecto de concentraciones crecientes de hCG sobre los niveles del ARNm de MKP-2. Las células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas por 120 minutos con diferentes concentraciones de hCG. Se evaluaron los niveles de los ARNm de MKP-2 y de GAPDH mediante PCR en tiempo real. Los niveles del ARNm de MKP-2 fueron normalizados contra los niveles del ARNm de GAPDH. Los datos representan el promedio \pm SEM de tres experimentos. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas, analizados por ANOVA seguido del test de Tukey.

Los siguientes experimentos se plantearon a fin de establecer el mecanismo involucrado en el aumento del ARNm de MKP-2 provocado por estimulación del RLH y la vía de señalización correspondiente. Mediante el uso de inhibidores específicos investigamos el grado de participación en el incremento del mensajero de MKP-2 de dos quinasas importantes en la señalización de LH: PKA y ERK1/2. Se utilizaron los compuestos H-89 (un inhibidor específico de PKA) y PD98059 (un inhibidor de la quinasa río arriba de ERK1/2, MEK1/2) y se evaluaron los niveles del ARNm correspondiente a MKP-2 en células controles o estimuladas con hCG u 8Br-AMPC, en presencia o ausencia de estos compuestos (Figura 14). Por otro lado, para determinar si el incremento en los niveles del mensajero ocurre como consecuencia de la activación de la transcripción génica, se hicieron experimentos en presencia y ausencia del inhibidor de la transcripción Actinomicina D (Act D) (Figura 14).

Se determinó que el bloqueo de la transcripción (Act D) suprime el efecto de hCG, indicando que la estimulación del RLH promueve la transcripción *de novo* del gen de MKP-2. Por otra parte, tanto H-89 como PD98059 redujeron la inducción del gen de MKP-2 dada por hCG, sugiriendo que el efecto hormonal es dependiente de PKA y de ERK1/2 (Figura 14).

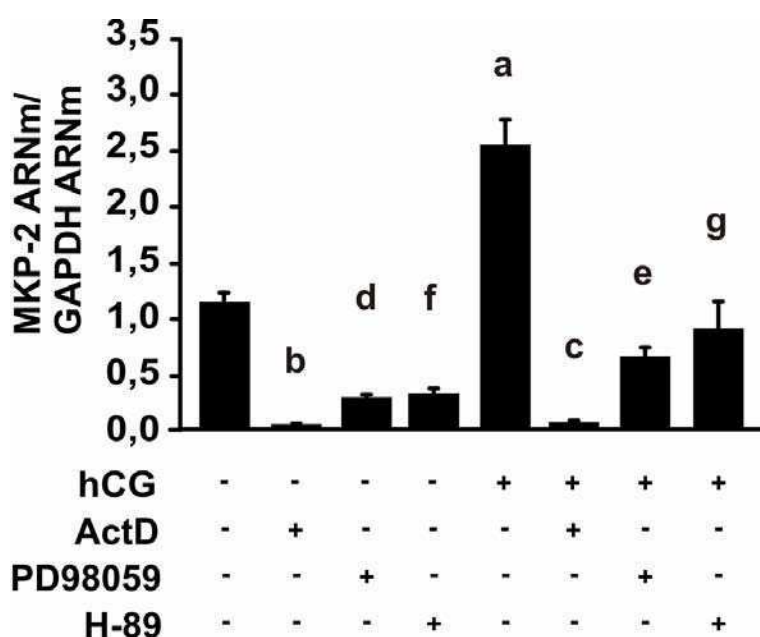


Figura 14. Análisis de la participación de PKA, ERK1/2 y de la transcripción *de novo* en el incremento del ARNm de MKP-2 promovido por hCG. Las células fueron incubadas en ausencia o presencia de 5 μ g/ml de Actinomicina D (ActD), 50 μ M de PD98059, o 10 μ M de H-89 y luego incubadas por 120 minutos en presencia o ausencia de 20 ng/ml de hCG. El ARNt total fue aislado, sujeto a transcripción reversa y PCR cuantitativa con oligonucleotidos específicos para el ADNc de MKP-2 y GAPDH. Los niveles de MKP-2 fueron normalizados contra los niveles de ARNm de GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes: a, $P < 0,001$; b, $P < 0,01$, d y f, $P < 0,05$ vs. células no estimuladas; c, e y g, $P < 0,001$ vs. células estimuladas con hCG

I.2. INCREMENTO DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA MKP-2 MEDIADO POR hCG

Los siguientes experimentos se realizaron a fin de determinar si la estimulación del RLH aumenta los niveles de la proteína MKP-2. Las células se estimularon por diferentes tiempos con hCG, luego se obtuvieron los lisados celulares totales y éstos se analizaron mediante Western Blot con un anticuerpo específico para MKP-2. Se demostró que los niveles de proteína de MKP-2 se incrementan luego de la estimulación hormonal, como ocurre con los niveles del ARNm correspondiente. La estimulación con hCG causó un aumento significativo de la proteína luego de 3 horas (aproximadamente 4 veces con respecto al control). Este incremento se mantuvo constante por lo menos hasta las 4 horas de estimulación (Figura 15).

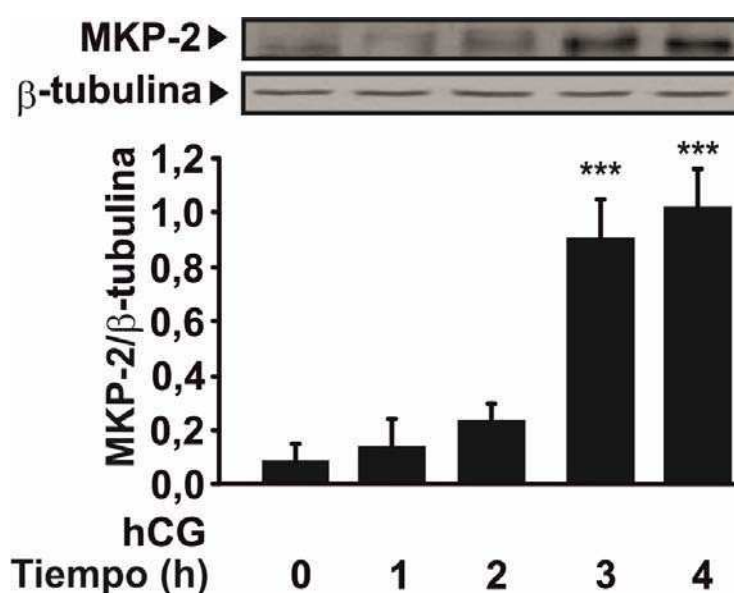


Figura 15. Análisis de los niveles de la proteína MKP-2 en células estimuladas con hCG. Las células fueron estimuladas con hCG (20 ng/ml) por los tiempos indicados, luego se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron las proteínas totales por Western blot con un anticuerpo anti-MKP-2. Las bandas específicas fueron detectadas por aumento de quimioluminiscencia. Las membranas fueron tratadas para remover los anticuerpos y luego incubadas con un anticuerpo anti-β-tubulina, a fin de detectar esta proteína como control de carga. La figura muestra *immunoblots* representativos (panel superior). Se cuantificó la densidad óptica integrada de cada banda y los valores de MKP-2 fueron normalizados contra su respectivo control de carga y los valores obtenidos expresados en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (panel inferior). ***, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas.

I.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE MKP-2

Se mencionó que la estructura primaria de MKP-2 incluye dos cortas secuencias en ambos extremos que determinan su ubicación en el núcleo. Dado que los resultados hasta aquí obtenidos indican que la estimulación del RLH produce la acumulación de la proteína, resultó de interés determinar en que compartimento subcelular se acumula la proteína. Con esta finalidad se realizaron estudios de inmunofluorescencia de las células de Leydig sometidas a diferentes tratamientos. Las células fueron cultivadas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina, luego privadas de suero por 24 horas e incubadas en presencia o ausencia de 8Br-AMPC durante 2, 5 ó 6 horas. Luego del tratamiento, las células fueron fijadas y tratadas en las condiciones descritas en Materiales y Métodos para visualizarlas mediante microscopía de fluorescencia.

Observamos que en ausencia de estímulo (Control) MKP-2 es casi indetectable. La estimulación a tiempos prolongados con 8Br-AMPC intensifica la señal de MKP-2, observándose una localización preponderantemente nuclear (Figura 16).

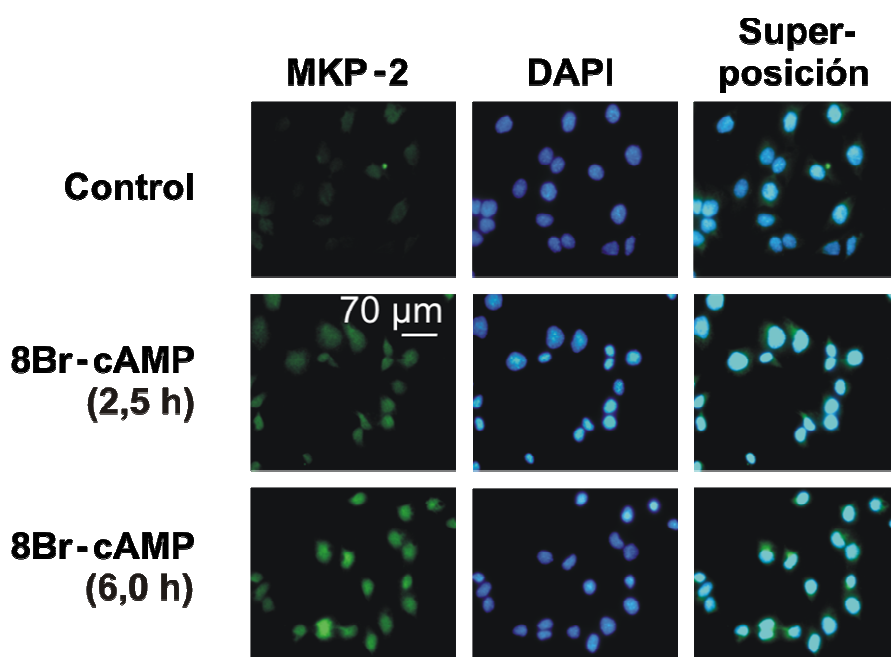


Figura 16. Distribución subcelular de la proteína MKP-2 en células de Leydig MA-10 analizada mediante microscopía de fluorescencia. Las células MA-10 se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 15.000 células/cm². Luego de 24 horas de cultivo en ausencia de suero fueron incubadas con 8Br-AMPC (0.5 mM) durante 2, 5 ó 6 horas. A continuación las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo específico anti-MKP-2 (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. La figura muestra una imagen representativa de 10 observaciones provenientes de 2 experimentos independientes con similares resultados.

Mediante análisis por microscopía de fluorescencia pudimos corroborar que en nuestro modelo de estudio proteína MKP-2 se localiza en el núcleo, como describe la bibliografía (102). Por otro lado el hecho que en condiciones basales la proteína es imperceptible y que se hace evidente luego de la estimulación es coincidente con los resultados obtenidos al analizar los lisados celulares por Western blot (Figura 15).

El conjunto de los resultados resumidos hasta aquí demuestran que en células de Leydig de la línea MA-10, la estimulación del receptor de LH con hCG promueve –a través de un mecanismo mediado por el sistema AMPc/PKA– un incremento de los niveles del ARNm y de la proteína MKP-2, la cual se localiza en el núcleo.

II. REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE MKP-2

II.1. CONSTRUCCIÓN DE pFLAG-MKP-2

Como se ha mencionado en la Introducción, la regulación de MKP-1 a nivel post-traduccional ha sido ampliamente reportada. Varios trabajos, incluso de nuestro grupo (221), han demostrado que la fosforilación por ERK1/2 en residuos específicos lleva a la acumulación de la proteína MKP-1. Dado que MKP-1 y MKP-2 están muy relacionadas estructuralmente, se planteó la posibilidad de una regulación post-traduccional de MKP-2 promovida por la activación del RLH en células de Leydig.

Como herramienta para lograr este objetivo se utilizó un vector conteniendo el ADNc de MKP-2 bajo el control de un promotor constitutivo. Para obtener esta herramienta se realizó el clonado del ADNc de MKP-2 en el vector p3XFLAG-CMV-10 siguiendo los procedimientos detallados en Materiales y Métodos, con lo cual se obtuvo la construcción pFLAG-MKP2. La transfección con este vector permite la expresión de una quimera, flag-MKP-2, compuesta por MKP-2 fusionada en su extremo amino a un pequeño péptido llamado flag. Esta quimera puede ser detectada eficientemente mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag. La cuantificación de los niveles de la proteína quimera flag-MKP-2 con el anticuerpo anti-flag, permite analizar si un determinado estímulo ejerce una acción regulatoria sobre MKP-2.

Para la obtención del plásmido pFLAG-MKP2 se extrajo el ARN total de células de Leydig de testículo de ratón a partir del cual se obtuvo el ADNc por transcripción reversa utilizando oligonucleótidos inespecíficos y una polimerasa de alta fidelidad. El fragmento obtenido (1.294 pb), correspondiente a los nucleótidos 86 a 1382 del mensajero de MKP-2 (NM_176933.4), fue clonado en el vector pGEM®-T

Easy (Promega). Luego, esta construcción fue utilizada como molde para una nueva PCR, la cual permitió amplificar el ADNc completo correspondiente a MKP-2 (1.262 kb). Los oligonucleótidos con los que se realizó esta amplificación contienen la secuencia consenso de corte para las enzimas de restricción NotI (en el oligonucleotido directo) y BamHI (en el oligonucleotido reverso). Por lo tanto, el amplicón obtenido contiene los sitios de corte para NotI y BamHI en los extremos 5' y 3' respectivamente de la secuencia del ADNc correspondiente a MKP-2. El amplicón de 1.262 pb y el vector p3XFLAG-CMV-10 fueron digeridos con las enzimas NotI y BamHI, para realizar a continuación la ligación. Así se obtuvo la construcción necesaria para la sobre-expresión de la proteína de fusión flag-MKP-2, como se describe más extensamente en Materiales y Métodos. Esta construcción fue analizada mediante un mapa de restricción y secuenciación. En la figura 17 se describen las características del segmento de MKP-2 clonado (Figura 17 A), y un pequeño mapa de restricción representativo (Figura 17 B).

II.2. EXPRESIÓN DE pFLAG-MKP-2 EN CÉLULAS DE LEYDIG

El vector de expresión de la quimera flag-MKP-2, una vez caracterizado, se utilizó para transfectar las células, lo cual 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. A continuación este medio es removido y reemplazado por medio fresco con antibiótico sin suero. 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. Esta eficiencia es 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

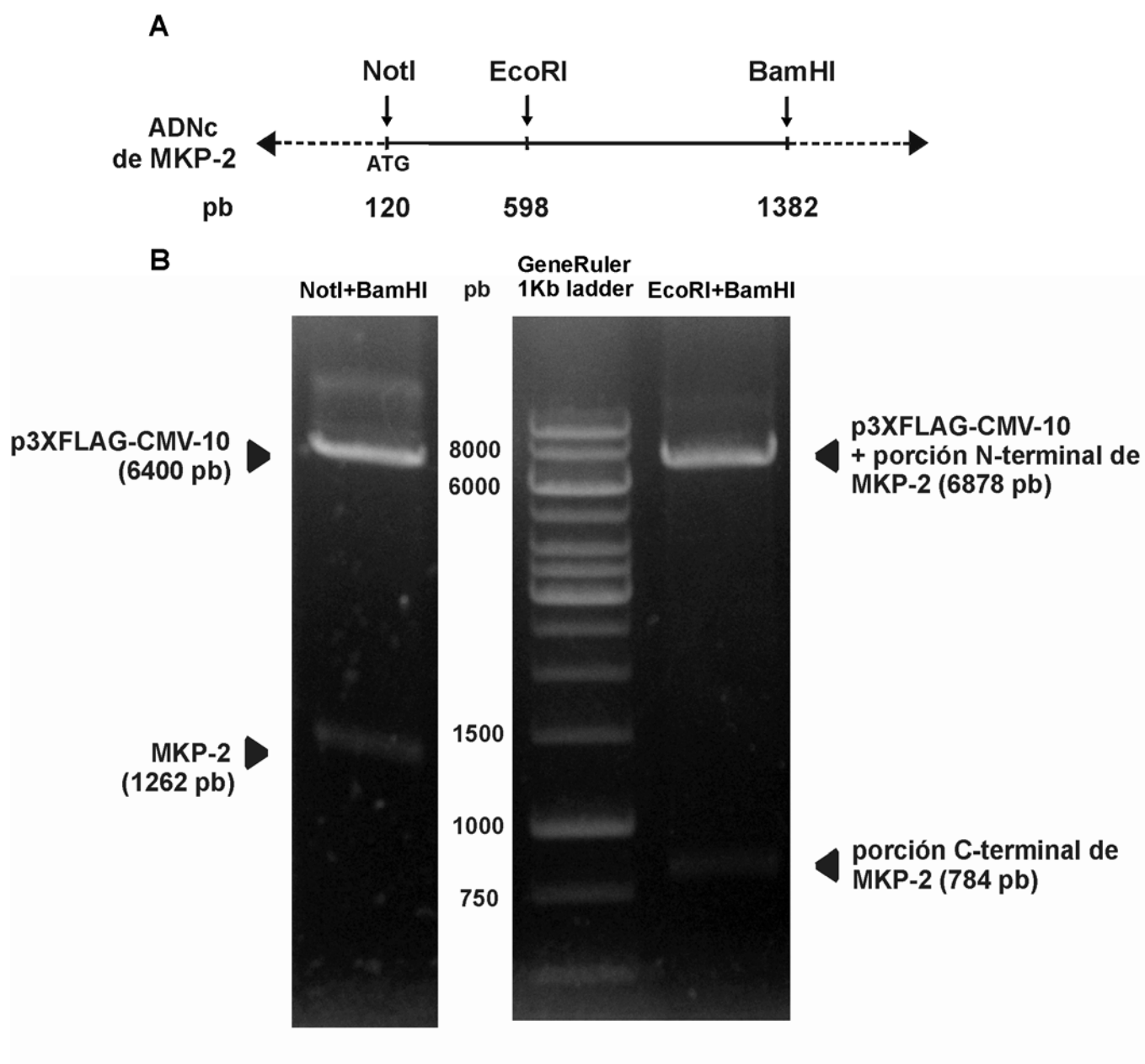


Figura 17. Clonado del ADNc de MKP-2 y obtención del plásmido de expresión pFLAG-MKP2. El gen de MKP-2 de ratón fue clonado a partir del sitio de inicio de la traducción en el vector p3XFLAG-CMV-10, entre los sitios de clonado NotI y NcoRI, para generar la proteína de fusión flag-MKP-2. La porción del gen de MKP-2 (120-1382 pb) corresponde a la secuencia codificante y contiene un solo sitio de corte para EcoRI en la posición 598 (**A**). Se corroboró la presencia del inserto de 1262 pb en el vector mediante digestión con enzimas de restricción y posterior análisis en geles de agarosa con bromuro de etidio (**B**).

Los experimentos siguientes se plantearon con el objetivo de determinar si la estimulación de las células promueve cambios en los niveles de la quimera flag-MKP-2. Con este fin las células se transfectaron con la construcción FLAG-MKP-2, luego se estimularon con hCG u 8Br-AMPC por tiempos variables y al término de los tratamientos se lisaron con el fin de evaluar los niveles de flag-MKP-2. El análisis por

Western blot de los lisados de células tratadas mostró que tanto hCG como 8Br-AMPC promueven un aumento en los niveles de la proteína flag-MKP-2. Este incremento se hizo evidente a las 2 horas de tratamiento, alcanzó su máximo entre las 3 y 5 horas (2,5 veces de incremento con respecto al control, aproximadamente) y declinó a los niveles controles luego de las 7 horas de tratamiento (Figura 18 A y B).

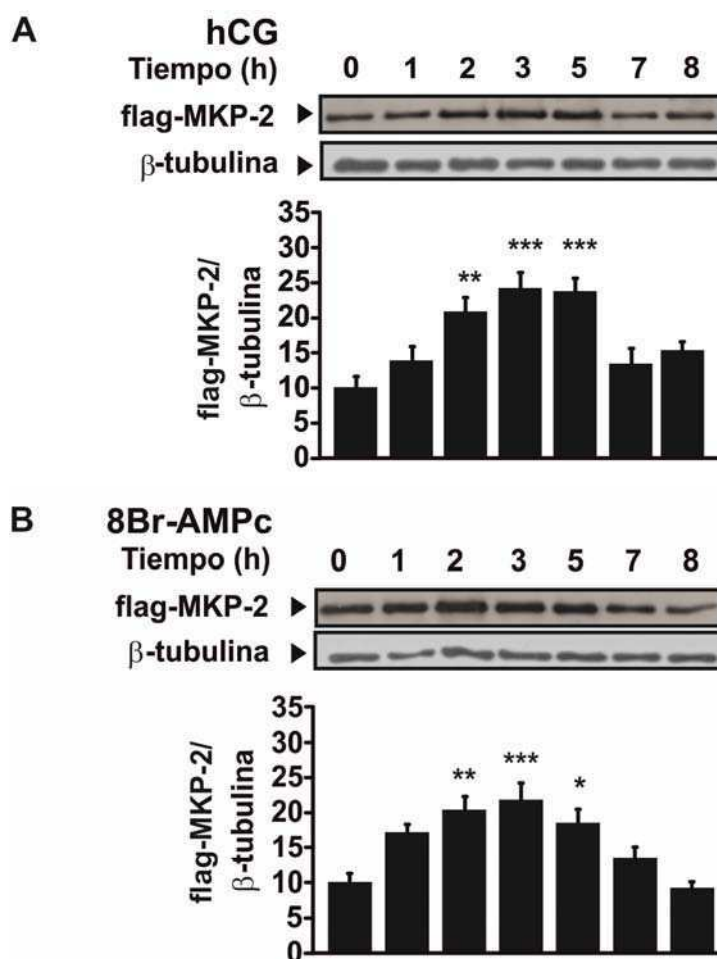


Figura 18. Niveles de expresión de flag-MKP-2 en células estimuladas con hCG u 8Br-AMPC. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-2. Luego de 24 horas de cultivo en ausencia de suero fueron incubadas con hCG 20 ng/ml (A) ó 8Br-AMPC 0,5 mM (B) durante los tiempos indicados. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-MKP-2 mediante Western blot utilizando primeramente un anticuerpo anti-flag y luego un anticuerpo anti-β-tubulina, para la detección de β-tubulina como control de carga. En la figura se muestran inmunoblots representativos (paneles superiores). La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias. Los datos graficados (paneles inferiores) representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. A y B: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs.células.no.estimuladas.

Los resultados precedentes sugirieron que la estimulación de las células provoca una modificación post-traducciona en MKP-2 que determina su acumulación. Sin embargo podría argumentarse que esa modificación que causa la acumulación de la quimera ocurre sobre la porción Flag- de la quimera. Aún cuando el clonado en el vector p3XFLAG-CMV-10 y la expresión de proteínas marcadas con el epítopo flag constituyen un sistema ampliamente caracterizado, procedimos a realizar los experimentos para descartar la posibilidad planteada. Con este fin las células se transfectaron con la construcción p3XFLAG-CMV-10-ERK2, para la expresión de la proteína flag-ERK2 y se estimularon durante distintos tiempos para evaluar finalmente los niveles de la proteína recombinante con el anticuerpo anti-flag. Comprobamos que los niveles de flag-ERK2 permanecen constantes y similares a los que se observa en las células no estimuladas (Figura 19).

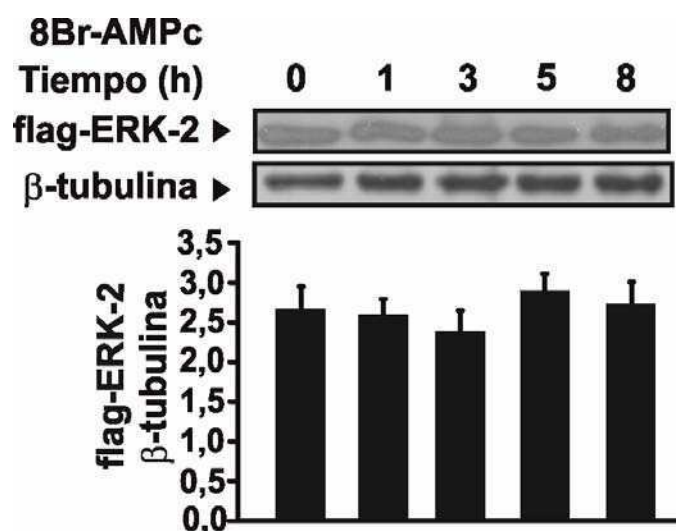


Figura 19. Análisis del efecto del 8Br-AMPC sobre los niveles de expresión de la quimera flag-ERK. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-ERK-2. Luego de 24 horas en cultivo sin suero fueron incubadas con 8Br-AMPC 0,5 mM durante los tiempos mostrados. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-ERK2 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag y posteriormente se evaluó el nivel de β-tubulina como control de carga, mediante revelado con anti-β-tubulina. Se muestran inmunoblots representativos (paneles superiores). La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias (panel inferior).

Demostramos que los niveles de la quimera flag-MKP-2 cambian a lo largo del tiempo de estimulación c 8Br-AMPC mientras los niveles de otra quimera que porta el epítopo flag no lo hacen. Esto permite descartar un efecto de este estímulo sobre la porción flag de la quimera. Estos resultados nos confirman que incremento en los

niveles de flag-MKP-2 provocado por la estimulación con hCG u 8Br-AMPC (Figura 18) involucran un efecto sobre MKP-2 específicamente.

Seguidamente se procedió a analizar las posibles vías de señalización involucradas en la regulación post-traducciona de MKP-2 por estimulación del RLH. Con este propósito las células se transfectaron con la construcción correspondiente y luego se incubaron con hCG u 8Br-AMPC durante 3 horas (tiempo que produce la máxima acumulación de la proteína quimera), en presencia o ausencia de inhibidores de PKA, MEK, H-89 y PD98059 (Figura 20, A y B). El inhibidor H-89 bloqueó la acumulación de flag-MKP-2 inducida por hCG y por 8Br-AMPC (Figura 20 A y B), resultado esperable en función del hecho que la acumulación de la quimera ocurre tanto por estimulación con la hormona como con 8Br-AMPC.

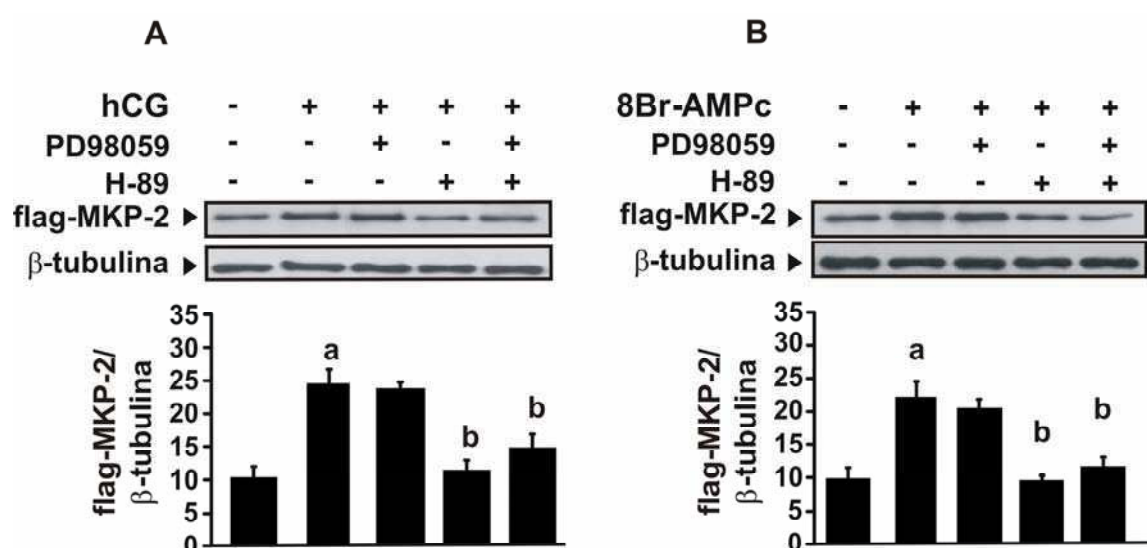


Figura 20. Análisis de la participación de PKA y ERK1/2 en la acumulación de flag-MKP-2 promovida por hCG y 8Br-AMPC. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-2. Luego de 24 horas en cultivo en medio libre de suero las células fueron incubadas por 30 minutos en ausencia o presencia de 50 μ M de PD98059 ó 10 μ M de H-89 y luego incubadas por 3 horas con 20 ng/ml de hCG (A) ó con 0.5 mM de 8Br-AMPC (B). Se obtuvieron luego los lisados celulares y éstos se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo anti-flag y luego el anticuerpo anti- β -tubulina para la detección de β -tubulina como control de carga. Los paneles superiores muestran inmunoblots representativos. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias. Los datos graficados, mostrados en el panel inferior, representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas; b, $P < 0,001$ vs. células estimuladas con hCG (A) o 8Br-AMPC (B).

Por otra parte el inhibidor de MEK PD98059 no modificó los niveles de la quimera flag-MKP-2 alcanzados luego de 3 horas de estimulación con la hormona o el

derivado del AMPc (Figura 20 A y B). Además el PD98059 no modificó el efecto de H-89 (Figura 20 A y B).

Los resultados mostrados indicaron que tanto hCG como 8Br-AMPC incrementan los niveles de flag-MKP-2 aún cuando ésta es expresada bajo un promotor constitutivo. Estos hallazgos nos llevaron a proponer que la estimulación del RLH promueve una modificación post-traducciona en MKP-2 que tiene como consecuencia un incremento de la estabilidad de la quimera. Para comprobar que la vida media de la quimera se incrementa por estimulación de las células realizamos experimentos de *Pulse and chase* (o Ensayo de Cicloheximida, como es menciona en Materiales y Métodos). Este ensayo consiste en acumular la quimera mediante estimulación durante un tiempo determinado, agregar luego al cultivo cicloheximida para bloquear la síntesis proteica y prolongar la incubación por diferentes tiempos para evaluar finalmente los niveles de la quimera mediante Western blot. La figura 21 muestra un esquema del protocolo de incubación (parte superior) y los resultados de los experimentos (parte inferior). Se comprobó que la estimulación con 8Br-AMPC incrementa la vida media de flag-MKP-2 (45 min vs. 100 min aprox) (Figura 21), lo cual es coincidente con la acumulación de la proteína recombinante promovida por 8Br-AMPC, según lo mostrado en la Figura 18 B.

Los experimentos siguientes se realizaron con el fin de indagar acerca del sistema enzimático involucrado en la degradación de MKP-2. Se procedió a evaluar los niveles de la proteína Flag-MKP-2 en células incubadas en presencia de un reconocido inhibidor del proteosoma, o de un inhibidor de serin proteasas, MG132 y TLCK respectivamente.

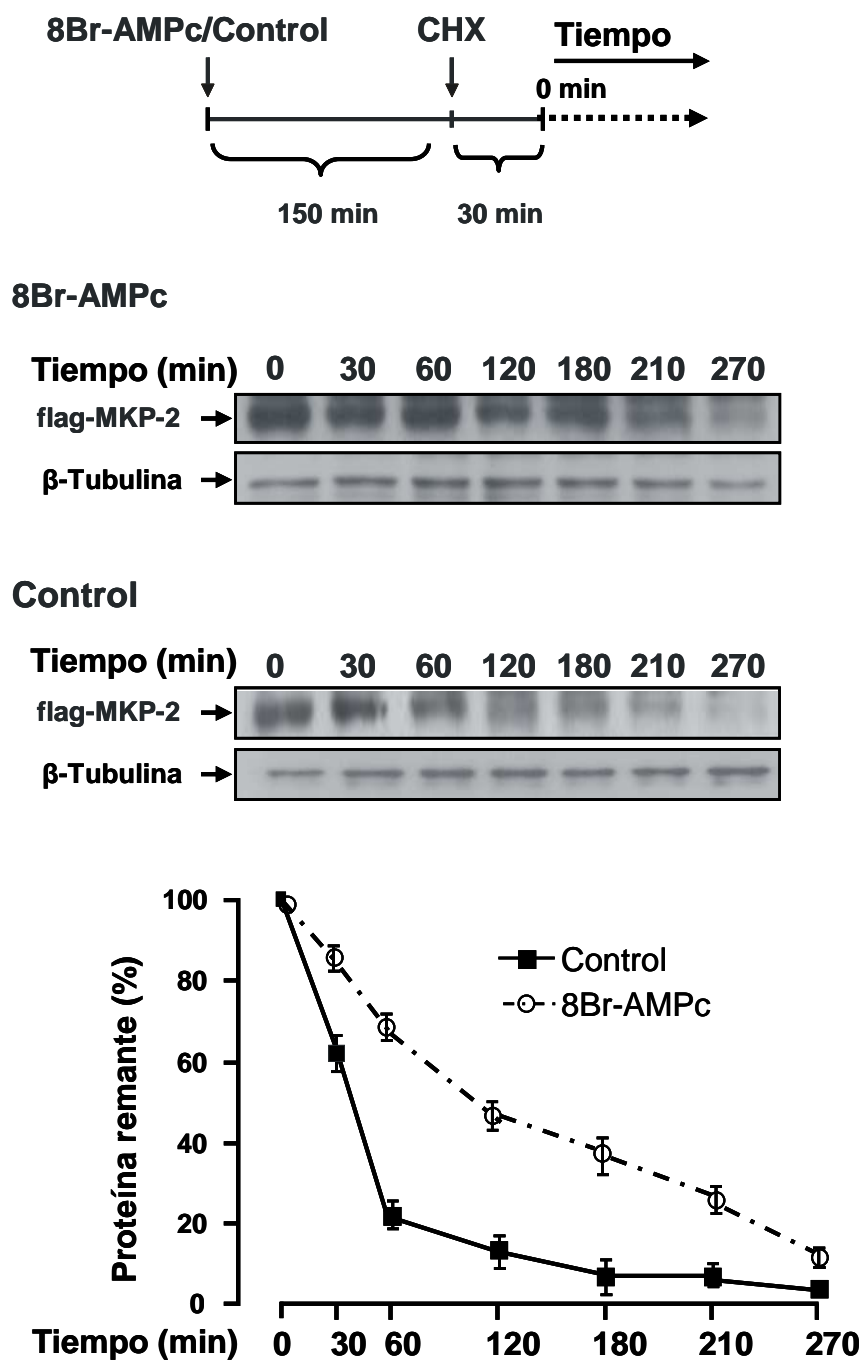


Figura 21. Determinación de la vida media de flag-MKP-2. Las células fueron transfectadas con pFLAG-MKP-2, privadas de suero por 24 horas, incubadas con o sin 0,5 mM 8Br-AMPc por 150 min y luego incubadas con 2 μ g/ μ l de cicloheximida (CHX) por los tiempos indicados (parte superior de la figura). Al término de las incubaciones se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron por Western blot usando los anticuerpos anti-flag primeramente y luego anti- β -tubulina como control de carga. La figura muestra inmunoblots representativos. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias, en valores porcentuales (100% corresponde a la intensidad registrada a tiempo 0) La figura muestra los datos de 3 experimentos independientes y representan la media \pm SEM.

Los resultados obtenidos mostraron que el MG-132 es capaz de acumular la proteína flag-MKP-2 (Figura 22). Este efecto fue significativo luego de 1 hora de tratamiento y progresó de manera dependiente del tiempo. En contraste, TLCK no incrementó los niveles de la proteína recombinante en el tiempo analizado (Figura 22).

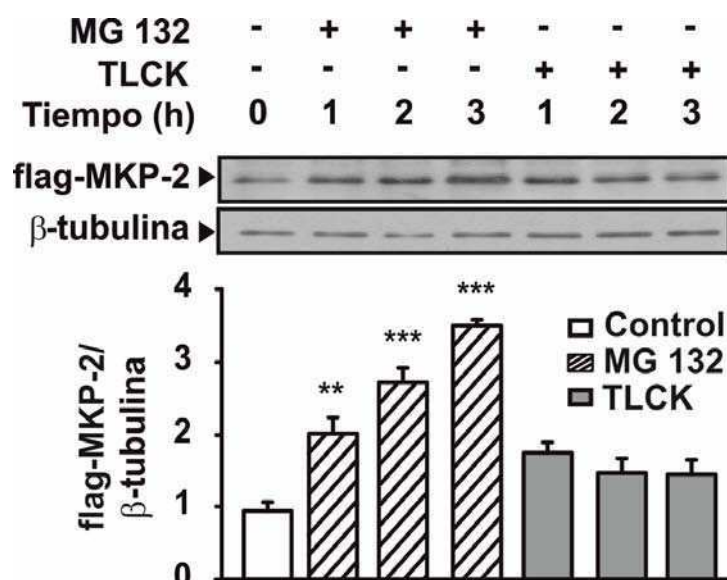


Figura 22. Sistema enzimático involucrado en la degradación de MKP-2. Las células fueron transfectadas con pFLAG-MKP-2, luego privadas de suero y finalmente incubadas en ausencia o presencia de 10 μ g de MG-132 o 10 μ g de TLCK por los tiempos indicados. Se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron por Western blot, utilizando los anticuerpos anti-flag y anti- β -tubulina, para la detección de las proteínas flag-MKP-2 y β -tubulina como control de carga. En la parte superior de la figura se muestran inmunoblots representativos. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias. Los datos obtenidos se muestran en el gráfico de la parte inferior y representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0.001 vs. células no tratadas.

Luego procedimos a comparar el efecto del MG-132 y del 8Br-AMPC sobre los niveles de flag-MKP-2. Observamos que los niveles de la quimera alcanzados luego de 3 horas de incubación con MG132 u 8Br-AMPC son similares (Figura 23). Se observó además que cuando el MG132 se agrega junto con el 8Br-AMPC no incrementa la acumulación provocada por cada uno de ellos (Figura 23).

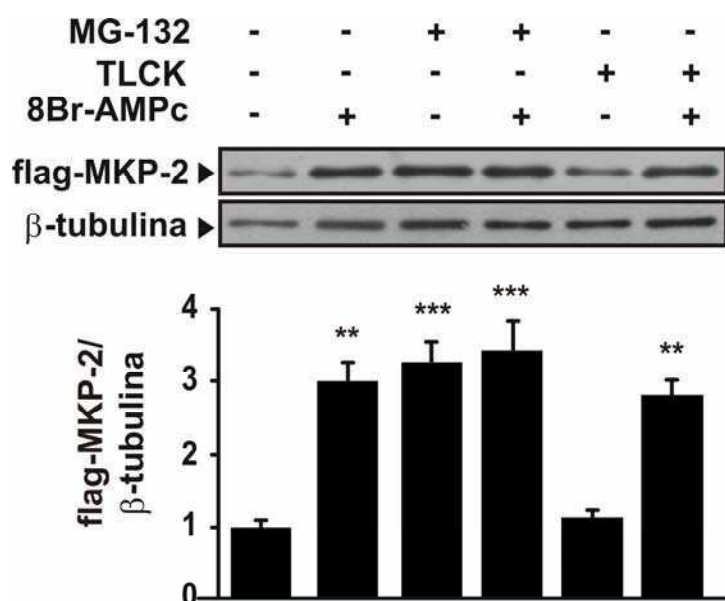


Figura 23. Estudio comparativo de la acción de diferentes inhibidores de proteasas y de 8Br-AMPC sobre los niveles de flag-MKP-2. Las células MA-10 fueron transfectadas con pFLAG-MKP-2, luego privadas de suero e incubadas sin o con 0,5 mM 8Br-AMPC por 3 horas, en ausencia o presencia de 10 µg de MG-132 o 10 µg de TLCK. Se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron por Western blot usando los anticuerpos anti-flag o anti-β-tubulina para la detección de la quimera y el control de carga respectivamente. En la parte superior de la figura se muestran inmunoblots representativos. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias. Los datos obtenidos se muestran en gráfico de la parte inferior y representan la media ± SEM de 2 experimentos independientes. * $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs. células no tratadas.

Previamente habíamos observado por microscopía de fluorescencia que en células MA-10 estimuladas la proteína MKP-2 se encuentra presente en el núcleo. Dado que la expresión de la proteína recombinante sería una estrategia para analizar el rol funcional de MKP-2 en las células de Leydig en una etapa más avanzada del trabajo, se procedió a analizar si la proteína recombinante se localizaba en el núcleo como lo hace la proteína endógena. Con este fin las células transfectadas para la expresión de flag-MKP-2 se estimularon con 8Br-AMPC durante 2,5 horas o se dejaron

sin estimular (control) y luego se analizaron por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo específico anti-flag. Como se muestra en la figura. 24, la quimera flag-MKP2 se detectó tanto en células controles como en células estimuladas. Además, en condiciones basales (control) la proteína recombinante se detectó tanto en el núcleo como en el compartimento extra-nuclear. Por otra parte se observó que la estimulación con 8Br-AMPC incrementa la señal de flag-MKP-2 predominantemente en el núcleo (Figura 24)

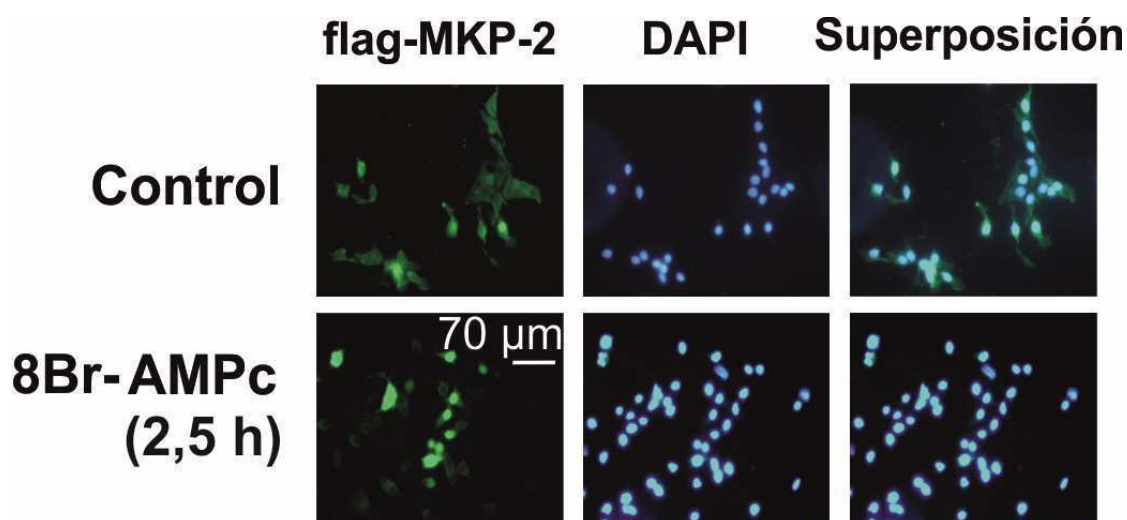


Figura 24. Análisis por microscopía de fluorescencia de la distribución subcelular de la proteína flag-MKP-2 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 15.000 células/cm². Al día siguiente fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-2 y, luego de 24 horas de cultivo en medio sin suero, incubadas con 8Br-AMPC 0,5 mM durante 2,5 horas. 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 (*superposición*). La figura muestra una imagen representativa de 10 observaciones provenientes de 2 experimentos independientes con similares resultados.

Resultados similares a los precedentes se observaron también al analizar el contenido de la proteína recombinante en las fracciones subcelulares de las células transfectadas para la expresión de la quimera (Figura 25). La proteína recombinante se detectó aún en las células no estimuladas, en contraste con lo que ocurre con la proteína endógena (ver figura 15), siendo notoria la señal citoplasmática (Figura 25). Más aún, la detección de la quimera en las células no estimuladas coincide con lo observado por inmunocitoquímica. Por otra parte la estimulación con 8Br-AMPC

incrementó los niveles de la proteína flag-MKP-2 en la fracción nuclear y redujo los niveles de la misma en la fracción citosólica (Figura 25).

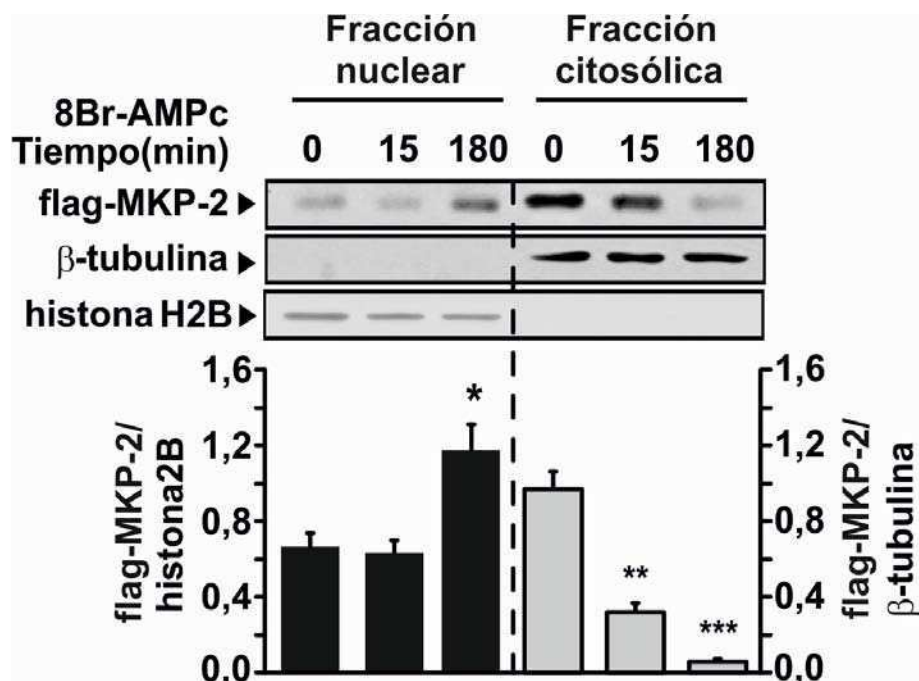


Figura 25. Niveles de flag-MKP-2 en las fracciones subcelulares de células estimuladas con 8Br-AMPC durante diferentes tiempos. Las células MA-10 fueron transfectadas con pFLAG-MKP-2, luego privadas de suero y estimuladas con 8Br AMPc 0,5 mM por los tiempos especificados. Se realizó el fraccionamiento subcelular y las proteínas nucleares y citosólicas analizaron por Western blot usando los anticuerpos anti-flag, anti-β-tubulina y anti-histona H2B, los dos últimos para la detección de los controles de carga β-tubulina e histona H2B. La figura muestra inmunoblots representativos. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga correspondiente y expresados en unidades arbitrarias. Los datos obtenidos se muestran en el gráfico de la parte inferior y representan la media ± SEM de 2 experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. células no tratadas.

La localización de flag-MKP-2 en el núcleo se observa principalmente en células estimuladas. Esto nos llevó a hipotetizar que la estimulación hormonal podría direccionar a MKP-2 hacia el núcleo, quizás a través de una modificación post-traducciona. Para investigar esta posibilidad analizamos por inmunocitoquímica células que fueron tratadas para acumular flag-MKP2 en ausencia de estimulación hormonal. Para lograr esto incubamos las células con el inhibidor del proteosoma MG-132 durante 1 hora. Luego se detuvo la síntesis proteica por la adición de cicloheximida (CHX) al medio de cultivo y después de 30 minutos se agregó ó no 8Br-AMPC al medio de cultivo por 15 minutos. Luego se analizaron las células por inmunocitoquímica.

La inmunomarcación de las células sin estimular (control) muestra una fuerte señal correspondiente a la presencia de flag-MKP-2 en citoplasma y núcleo. Esta distribución cambió notablemente luego de la estimulación, dado que un corto período de estimulación con 8Br-AMPC resultó en una débil ó nula señal en el compartimiento extra nuclear y una fuerte señal en el núcleo (Figura 26).

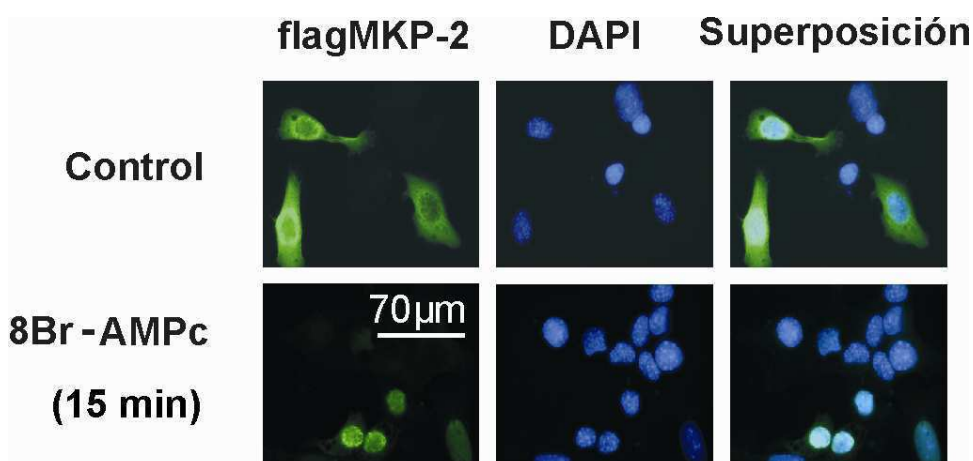


Figura 26. Análisis por microscopía de fluorescencia de la distribución subcelular de la proteína flag-MKP-2 acumulada por MG-132 en células de Leydig MA-10. Las células se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 15.000 células/cm². Al día siguiente fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-2, luego privadas de suero durante 24 horas y a continuación incubadas por 1 h en presencia de 10 µM de MG-132. Se agregó al medio cicloheximida (CHX) y luego de 30 min las células se incubaron sin (Control) o con 0.5 mM de 8Br-AMPC por 15 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 (*superposición*). La figura muestra una imagen representativa de 10 observaciones provenientes de 2 experimentos realizados de manera independientes con similares resultados.

Dado que la estimulación fue realizada en un período de tiempo corto y en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica, la proteína acumulada en el núcleo no pudo haber sido sintetizada durante este período de estimulación. Por lo tanto la proteína acumulada en el núcleo necesariamente tiene que haber venido del espacio extra-nuclear. En conjunto, estos estudios sugieren que la estimulación de las células de Leydig MA-10 con 8Br-AMPC promueve la localización nuclear de MKP-2 a través de un mecanismo post-traduccional.

Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia fueron confirmados mediante el análisis de las células sometidas a diferentes tratamientos por microscopía confocal. En células no estimuladas la proteína endógena se detectó como una débil señal en el compartimiento extra-nuclear, mientras que en las células estimuladas con 8Br-AMPC durante 2,5 horas la señal correspondiente a MKP-2 se detectó con mayor

intensidad y fundamentalmente en el núcleo (Figura 27, panel A, izquierda). En células transfectadas para la expresión de flag-MKP-2, la detección con el anticuerpo anti-flag permitió detectar una señal, aún en las células controles, en el espacio extra-nuclear (Figura 27, panel A, derecha). La estimulación con 8Br-AMPC incrementó la señal correspondiente a la quimera flag-MKP-2, en este caso la señal se detectó tanto en el núcleo como en el espacio extra-nuclear (Figura 27, panel A, derecha).

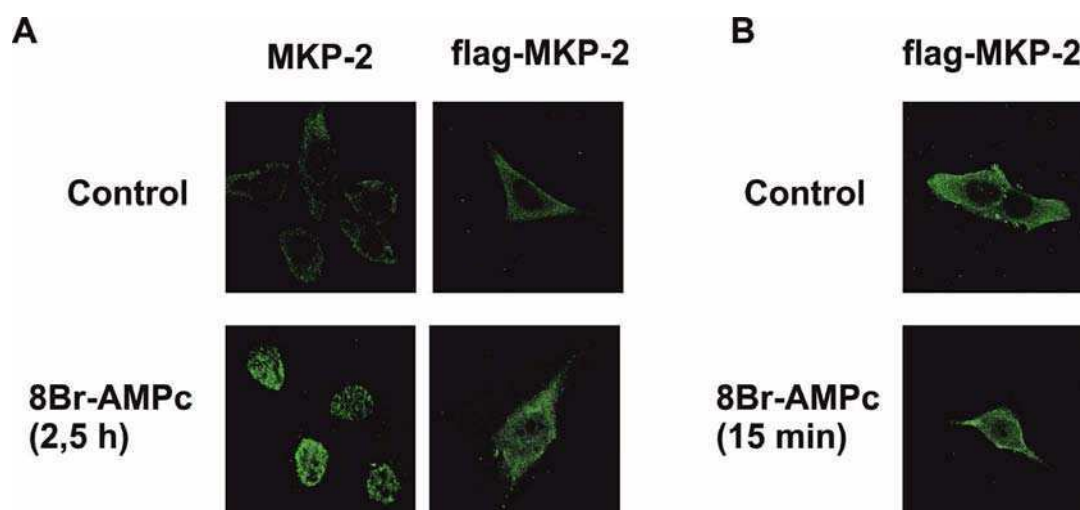


Figura 27. AMPc promueve la acumulación de flag-MKP-2 en el núcleo. Las células de Leydig de la línea MA-10 fueron crecidas en cubreobjetos, incubadas en medio sin suero por 24 hs, estimuladas o no (control) con 0,5 mM de 8Br-AMPC por 2,5 horas, fijadas y sujetas a inmunofluorescencia usando un anticuerpo contra MKP-2 y analizadas por microscopía confocal (panel A, izquierda). Las células fueron crecidas en cubreobjetos, transfectadas con pFLAG-MKP-2, incubadas en medio sin suero por 24 horas, y finalmente estimuladas o no (control) con 0,5 mM de 8Br-AMPC por 2,5 horas (panel B, derecha) o incubadas por 1 hora en presencia de 10 μ M de MG132, luego incubadas con 8Br-AMPC por 15 minutos en presencia de CHX, que se agregó 30 minutos antes que el 8Br-AMPC (B). Las células fueron luego fijadas, sujetas a inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-flag, y luego analizadas por microscopía confocal (panel A, derecha, y panel B).

En el panel B se muestra la distribución de la quimera flag-MKP-2 cuando ésta se acumula en ausencia de estímulo hormonal por incubación con MG132 durante 1 hora, como se describe para el experimento descrito en la figura 25. En estos experimentos, luego de la incubación con MG132 y del agregado de CHX, las células se incubaron sin (control) ó con 8Br-AMPC por 15 min. Se observó que luego de estos tratamientos la quimera flag-MKP-2 se localiza en el espacio extra-nuclear de las células no estimuladas (control), en cambio en las células estimuladas la quimera se detecta igualmente distribuída entre el núcleo y el espacio extra-nuclear (Figura 27).

La distribución de la quimera acumulada por incubación con MG132 también se analizó mediante el fraccionamiento subcelular y subsiguiente análisis por Western blot. Se observó que la estimulación con 8Br-AMPC incrementa los niveles de flag-MKP-2 en la fracción nuclear y los disminuye en la fracción citosólica (Figura 28).

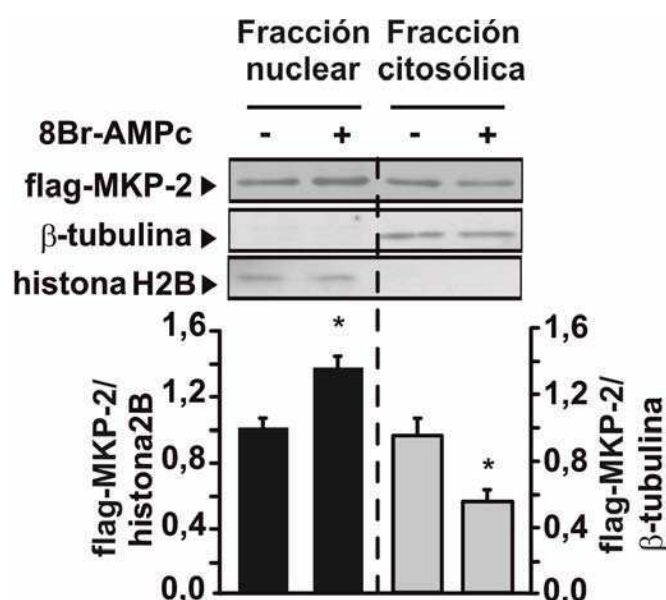


Figura 28. Análisis de la distribución de la proteína flag-MKP-2 acumulada por MG-132 en las fracciones celulares. Las células MA-10 fueron transfectadas con pFLAG-MKP-2, luego cultivadas en medio sin suero por 24 hs, incubadas por 1 h en presencia de 10 μ M de MG-132, y luego incubadas CHX. Después de 30 minutos se agregó ó no 0.5 mM de 8Br-AMPC por 15 minutos. Las células fueron luego homogeneizadas y sujetas a fraccionamiento subcelular. Las proteínas nucleares y citosólicas fueron analizadas por Western blot usando los anticuerpos anti-flag, anti- β -tubulina y anti-histona H2B (los últimos dos como controles de carga). Se muestran inmunoblots representativos. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga correspondiente y expresados en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. * P < 0.05; vs. células no tratadas con 8Br-AMPC.

Los resultados alcanzados hasta aquí sugerían que la estimulación de las células produce una modificación post-traduccional en MKP-2 –dependiente de PKA pero independiente de ERK1/2– que provoca su acumulación y posiblemente contribuya a la localización de la proteína en el núcleo (Figuras 20 y 27). Consideramos que la estimulación podía promover la fosforilación de la proteína por una acción directa de PKA. Por lo tanto se analizó la secuencia aminoacídica de MKP-2 con el programa NetPhosK 1.0 con el fin de determinar cuán probable resulta la fosforilación de MKP-2 por PKA. Esta búsqueda indicó que el más alto score, 0,77, corresponde a la fosforilación por PKA en la posición Serina 319.

En base a estos antecedentes se realizó la mutación sitio dirigida en el vector FLAG-MKP-2 con el fin de expresar la quimera flag-MKP-2 S319A en células transfectadas con ese vector. Obtenida esta construcción se transfectaron las células con la misma o con la forma *wild type* (WT) y se analizaron los niveles de flag-MKP-2 S319A y flag-MKP-2 WT respectivamente acumulados luego de 3 horas de estimulación con 8Br-AMPC (Figura 29). El análisis por Western blot con el anticuerpo anti-flag mostró que en las células estimuladas con 8Br-AMPC la señal correspondiente a flag-MKP-2 S319A es más débil que la señal correspondiente a flag-MKP-2 WT.

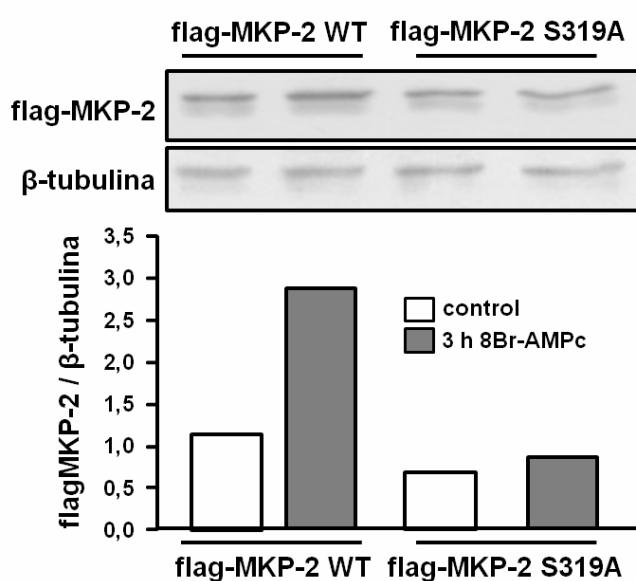


Figura 29. Análisis de la acumulación por 8BrAMPC de flag-MKP-2 S319A. Las células fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-2 conteniendo la secuencia WT de MKP-2 o la mutada en Serina 319 por un residuo de Alanina (flag-MKP-2 WT y flag-MKP-2 S319A respectivamente). Al día siguiente se inició la privación de suero que se prolongó por 24 horas. Luego de estimular las células con 0.5 mM de 8Br-AMPC durante 3 horas, se obtuvieron los lisados celulares y éstos se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo anti-flag y luego el anticuerpo anti-β-tubulina para la detección de β-tubulina como control de carga. Los paneles superiores muestran los inmunoblots. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias. Los datos corresponden a un experimento.

III. ROL FUNCIONAL DE MKP-2 EN LA REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESTEROIDOGÉNESIS

Una vez que comprobamos que LH regula de manera estricta los niveles de la proteína MKP-2, a través de mecanismos transcripcionales y post-traduccionales, nuestro siguiente desafío consistió en determinar el papel funcional de la misma en la acción hormonal. Hemos mencionado en la sección Introducción que las MAPKs regulan tanto la actividad como la expresión de un amplio grupo de factores de transcripción y que la actividad de las MAPKs juega un rol importante en ambos eventos. Además, hemos mencionado que LH, como así también ACTH, promueven la activación transitoria de ERK1/2. Incluso ACTH promueve también la activación de JNK, mientras que la activación de JNK por LH en células de Leydig, según nuestro conocimiento, no ha sido descrita. La participación de MAPKs en el mecanismo de acción de hormonas esteroideogénicas, particularmente en lo que se refiere a ERK1/2, también fue discutida en la sección Introducción. Teniendo en cuenta estos antecedentes pensamos que la acción primaria de MKP-2 podría estar dirigida a inactivar a ERK1/2 luego de la estimulación del RLH. Eventualmente también podría participar en la inactivación de JNK1/2 en el caso que LH promueva la activación de estas quinasas. Como consecuencia de esta acción primaria, MKP-2 podría modular la expresión de genes dependientes de ERK, en el contexto de la estimulación de la célula de Leydig con LH. Los experimentos que se describen a continuación fueron diseñados y llevados a cabo con el fin de analizar las hipótesis planteadas y definir el papel funcional de MKP-2 en la acción de LH.

III.1 CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO PARA GENERAR UN ARN DE INTERFERENCIA Y BLOQUEAR LA EXPRESIÓN DE MKP-2

Para evaluar el rol funcional de MKP-2 en células de Leydig fue necesario diseñar una estrategia para aumentar o disminuir los niveles de esta proteína en forma independiente del estímulo hormonal. La estrategia utilizada con ese fin consistió en transfectar transitoriamente las células con vectores que permiten la sobre-expresión o la disminución de la expresión de MKP-2. Para la sobre-expresión se construyó el vector pFLAG-MKP-2 que, como se describió en el capítulo anterior, permite la expresión de la quimera flag-MKP-2. Para la disminución de la expresión de MKP-2 se utilizó una construcción que permite la expresión de un ARN de interferencia. Con ese fin se diseñaron oligonucleótidos específicos cuya secuencia es idéntica a una región

del ARNm de MKP-2 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-2 (Figura 30). La transfección de las células con esta construcción, que dirige la expresión del ARN denominado *short hairpin* ARN, shARN, lleva a la degradación específica del ARNm de MKP-2. Como se describe en Materiales y Métodos, se diseñaron y obtuvieron dos plásmidos que contienen los mismos nucleótidos que las secuencias *target*, pero alineados al azar (*Scramble*). Esos plásmidos se usaron como controles en los experimentos en los que se usaron los correspondientes shARN MKP-2 y se designaron como Scr 1 y Scr2, para los shARN 1 y 2 respectivamente.



Figura 30. Esquema del vector utilizado para disminuir la expresión de la proteína MKP-2 en células de Leydig MA-10 mediante la estrategia de shARN. Se diseñaron oligonucleótidos de 19 pb de secuencia idéntica a una región del ARNm de MKP-2 (secuencia *target*, en negrita en la figura) 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, entre los sitios *HindIII* y *BglII*.

Para evaluar la efectividad de los shRNA obtenidos se analizaron los niveles de flag-MKP-2 en las células co-transfectadas con el plásmido pFLAG-MKP-2 y con el plásmido que expresa el shARN a evaluar (shARN1MKP-2 o shARN2MKP-2) y que es específico para MKP-2 o con los plásmidos Scr1 o 2. En células transfectadas con la construcción Scr (células controles), se detectó la señal correspondiente flag-MKP-2, la cual se intensificó luego de 2,5 horas de estimulación con 8Br-AMPC. En células transfectadas con las construcciones shARN 1 o 2 se observó una marcada disminución de los niveles de flag-MKP-1 con respecto a los niveles detectados en los

controles (Scr), tanto en células no estimuladas como estimuladas con 8Br-AMPC (Figura 31, panel A), lo cual muestra la efectividad de los shARN diseñados. Cabe mencionar que se obtuvieron los mismos resultados cuando se compararon los efectos de shARN1MKP-2 o shARN2MKP-2 respecto a Scr 1, Scr2 o el correspondiente plásmido vacío (resultados no mostrados).

Era importante verificar que estos *shARN* no afectaban los niveles de MKP-1, ya que ésta es una fosfatasa que tiene una alta homología con MKP-2. Para verificar la especificidad de los shARN co-transfectamos cada shARN o los correspondientes Scr con la construcción pFLAG-MKP-1, utilizado y descrito previamente (221), y evaluamos los niveles de flag-MKP-1 con el anticuerpo anti-flag. Corroboramos que ninguno de los shARN afecta los niveles de flag-MKP-1 (Figura 31, panel B).

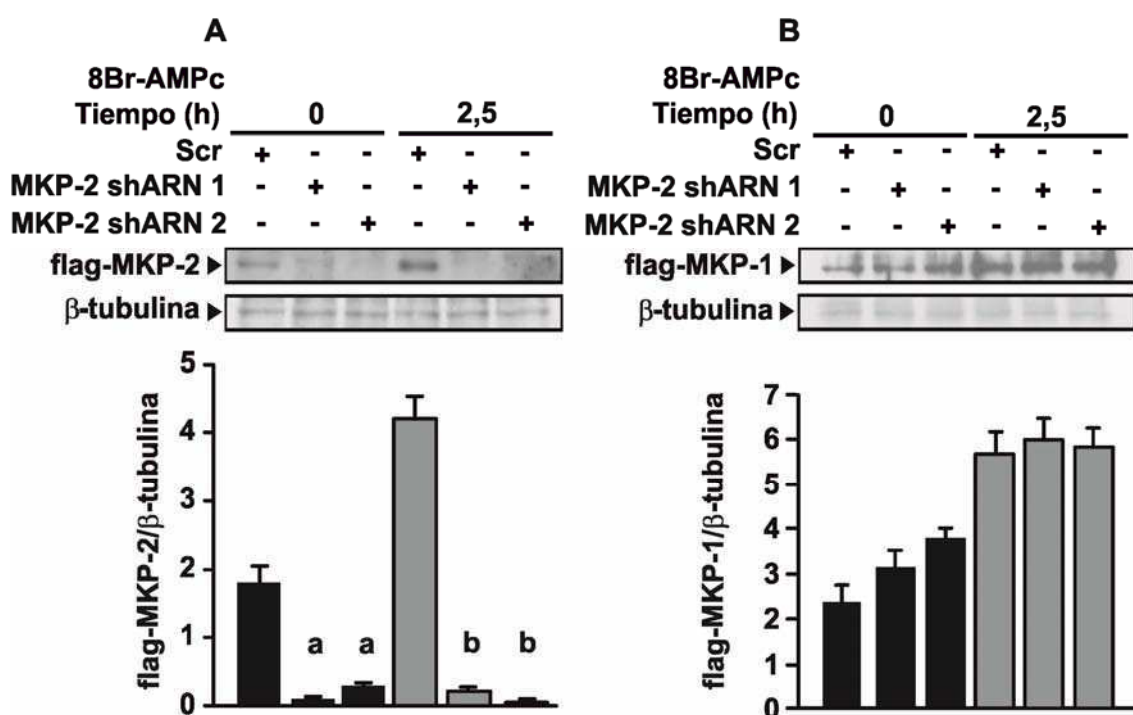


Figura 31. Efecto de la transfección de las células MA-10 con el shARN MKP-2 1 y 2 sobre los niveles de expresión de las proteínas flag-MKP-2 y flag-MKP-1. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector pSUPER.retro-Scr (Scr1) o con pSUPER.retro-MKP-2 (shARN MKP-2) de dos diferentes clones (clon 1 y clon 2) junto con los vectores de expresión pFLAG-MKP-2 (A) o pFLAG-MKP-1 (B). Al día siguiente, las células fueron privadas de suero por 24 hs y luego estimuladas con Br-AMPC (0,5 mM) por los tiempos indicados. Las células luego fueron lisadas y las proteínas fueron analizadas por Western blot usando los anticuerpos anti-flag o anti- β -tubulina para la detección de β -tubulina como control de carga. Se muestran inmunoblots representativos. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de flag-MKP-2 y flag-MKP-1 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes. a y b, $P < 0.001$ vs. células transfectadas con pSUPER.retro-Scr

Luego de comprobar que ambos shARN MKP-2 son efectivos y específicos para disminuir la expresión de MKP-2, continuamos trabajando con el MKP-2 shARN 1, el cual denominaremos de ahora en más como shARN MKP-2.

III. 2. EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN O INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MKP-2 SOBRE EL GRADO DE FOSFORILACIÓN DE ERK1/2

Nuestra hipótesis plantea que MKP-2 participa en la desfosforilación de ERK1/2, por lo tanto el siguiente paso fue evaluar en que medida la expresión del shARN MKP-2 afecta el grado de fosforilación de estas MAP quinasas en las células estimuladas durante diferentes tiempos. El diseño experimental consistió en evaluar los niveles de fosfo-ERK1/2 que se alcanzan por estimulación con 8Br-AMPC en células que expresan ya se el shARN dirigido contra MKP-2 o la secuencia Scr.

Primeramente determinamos la cinética de activación de ERK1/2 en células de Leydig MA-10 estimuladas por tiempos prolongados con 8Br-AMPC. Conociendo esta cinética podríamos predecir si la inducción de MKP-2 es compatible con la desfosforilación de ERK1/2 por esta fosfatasa. En los lisados celulares se analizaron los niveles de fosfo-ERK1/2 (pERK 1/2) mediante Western Blot. Se observó un rápido y transitorio incremento en los niveles de pERK1/2 en células estimuladas con 8Br-cAMP (0-180 min) (Figura 32). Aún cuando la señal de pERK parece extinguirse luego de 120 minutos de estimulación, largas exposiciones de los inmunoblots mostraron a los 140-200 min de estimulación niveles de p-ERK1/2 más altos que en las células no estimuladas (tiempo 0) (Figura 32), lo cual indica que aún después de 140 minutos de estimulación ERK1/2 aún persiste en su forma activa.

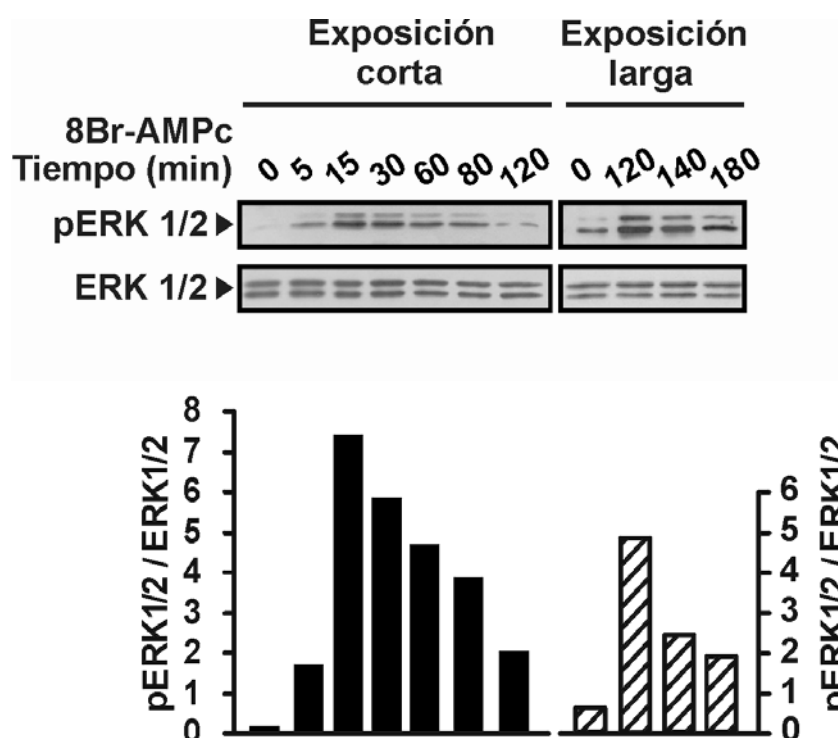


Figura 32. Cinética de la activación de ERK1/2 por 8Br-AMPC en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron privadas de suero e incubadas en ausencia o presencia de 0.5 mM de 8Br-AMPC por los tiempos indicados. Las células fueron lisadas y las proteínas analizadas por Western blot usando los anticuerpos anti-pERK1/2 o anti ERK1/2 total como control de carga. Se muestran inmunoblots representativos (arriba). La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de pERK1/2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias (abajo).

Luego analizamos el efecto de la expresión de shARN o Scr sobre los niveles de pERK, particularmente en esos tiempos ya que ese marco temporal es compatible con la aparición de MKP-2. Observamos que hasta los 140 minutos de estimulación los niveles de pERK1/2 no son significativamente diferentes en células MA-10 que expresan transitoriamente las secuencias shARN o Scr (Figura 33). Sin embargo, luego de 180 y 200 minutos de estimulación, los niveles de pERK1/2 en células que expresaban el shARN fueron significativamente mayores que en células que expresaban la secuencia Scr estimuladas por los mismos tiempos (Figura 33).

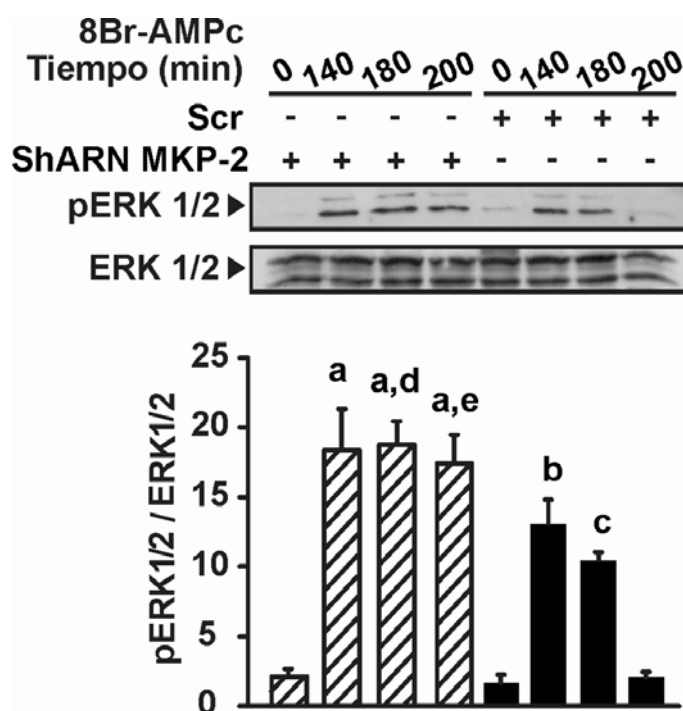


Figura 33. Efecto del silenciamiento de MKP-2 sobre la fosforilación de ERK1/2. Las células MA-10 fueron transfectadas con los vectores pSUPER.retro-MKP-2 (shARN MKP-2) o pSUPER.retro-scramble (Scr). Al día siguiente, las células fueron privadas de suero por 24 hs y luego estimuladas con 8Br-AMPC (0,5 mM) por los tiempos indicados. Las células fueron luego lisadas y las proteínas analizadas por Western blot usando los anticuerpos anti-pERK1/2 o anti ERK1/2 total como control de carga. En la parte superior se muestran inmunoblots representativos. La densidad óptica integrada de cada banda fue cuantificada y los valores de pERK1/2 fueron normalizados contra el control de carga y expresados en unidades arbitrarias. Los datos graficados (abajo) representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas que expresan pSUPER.retro-MKP-2 (shARN MKP-2); b, $P < 0,01$ y c, $P < 0,05$ vs. células no estimuladas que expresan pSUPER.retro-scramble (Scr); d, $P < 0,05$; e, $P < 0,001$ vs células que expresan pSUPER.retro-scramble (Scr) y estimuladas con 8Br-AMPC por el mismo período.

III. 3. EFECTO DE MKP-2 SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN CYP11A1

Se ha demostrado que algunos factores de transcripción que participan en la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis son de expresión y/o actividad dependiente de la actividad de ERK1/2 (199). Por lo tanto, variaciones en los niveles de pERK se traducen en variaciones en la tasa de expresión de esos genes. Hemos demostrado por ejemplo que la expresión de MKP-1 reduce los niveles de pERK1/2 a tiempos cortos de estimulación con 8Br-AMPC (0-60 min) y reduce la expresión de StAR (221). Haciendo un paralelismo con lo observado con MKP-1,

podría postularse que MKP-2 afecta la expresión de genes que se inducen por LH/hCG. Sin embargo, conociendo que la inducción de MKP-2 se detecta a las 2 horas de estimulación -tiempo en el cual los niveles del ARNm de StAR alcanzan aproximadamente un nivel máximo- sería ilógico suponer que la expresión de MKP-2 altera los niveles de expresión de genes de la etapa aguda de la estimulación hormonal. Teniendo en cuenta estas consideraciones pensamos que MKP-2 podía modular la expresión de aquellos genes que se inducen por estimulación hormonal crónica y nos focalizamos en el gen CYP11A1. La expresión del gen CYP11A1 inducida por LH/cAMP ocurre luego de un largo período de estimulación y depende de la actividad de ERK1/2 (192, 242). Es por esto que hipotetizamos que la expresión de MKP-2, por su acción sobre la actividad de ERK1/2, podría contribuir a regular la expresión de CYP11A1 tanto como MKP-1 lo hace sobre la de STARD1 (221). Para corroborar esta posibilidad, primeramente analizamos la dependencia de la actividad del promotor de CYP11A1 inducida por 8Br-AMPC con la actividad de ERK1/2. Con este fin las células MA-10 fueron co-transfectadas con los plásmidos pGL3-CYP11A1 y pRL, para la expresión de la luciferasa bajo el promotor del gen CYP11A1 y la luciferasa de Renilla respectivamente, y luego estimuladas con 8Br-AMPC durante 12 horas, en presencia o ausencia de PD98059, un inhibidor de MEK que impide la activación de ERK1/2. Luego se determinó la actividad de luciferasa en los lisados celulares y se demostró que la estimulación con 8Br-AMPC aumenta significativamente la actividad del promotor (aproximadamente 2,5 veces con respecto al control) y que este efecto es bloqueado por el inhibidor de MEK. Este resultado demuestra que la inducción del gen CYP11A1 por AMPC es dependiente de la actividad de ERK1/2 (Figura 34).

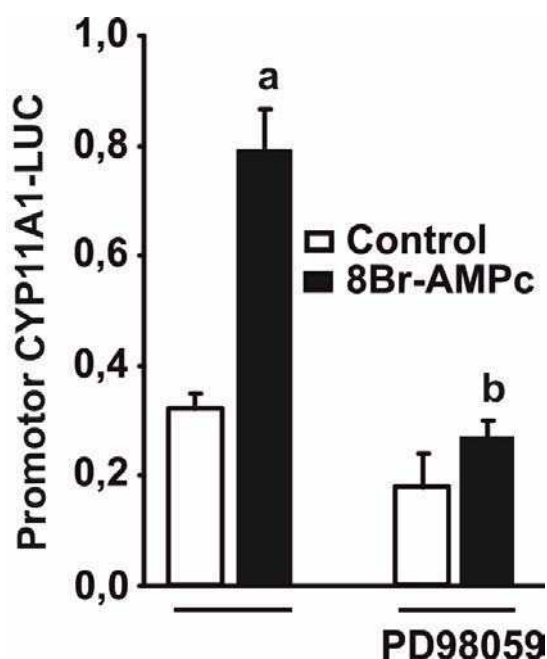


Figura 34. Efecto de la inhibición de la actividad de ERK1/2 sobre la actividad del promotor de CYP11A1. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector reportero pGL3-CYP11A1 y el vector control pRL que expresa la luciferasa *Renilla*. Luego de 48 horas, las células fueron estimuladas con 0,5 mM 8Br-cAMP por 12 horas en presencia o ausencia de PD98059 50 μ M. Luego se evaluó la actividad de luciferasa en los lisados celulares. Cada valor fue normalizado contra la actividad de la luciferasa *Renilla*. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. células no estimuladas incubadas en ausencia de PD98059; b, $P < 0,00$. células estimuladas con 8Br-cAMP e incubadas en ausencia de PD98059.

Luego de comprobar que el bloqueo de la activación de ERK1/2 impide la activación del promotor del gen CYP11A1 por 8Br-AMPC evaluamos si la expresión de MKP-2 era capaz de modular la acción del AMPC sobre ese promotor. Los experimentos diseñados con este fin consistieron en evaluar la actividad del promotor en células con diferente nivel de expresión de MKP-2 estimuladas con 8Br-AMPC. Las células se co-transfectaron con los plásmidos pGL3-CYP11A1 y pRL junto con el plásmido pSUPER.retro-MKP-2 o el plásmido pFLAG-MKP-2 (MKP-2 ADNc), para anular la expresión del MKP-2 mediante el shARN MKP-2 o para sobre-expresar MKP-2 respectivamente. También el plásmido reportero y el pRL se co-transfectaron con el plásmido p-FLAG (control) o con el plásmido pSUPER.retro-scramble para expresar la secuencia Scr. Se demostró que la sobre-expresión de MKP-2 reduce significativamente la actividad del promotor de CYP11A1 inducida por el tratamiento con 8Br-AMPC. Por su parte, el silenciamiento de MKP-2 mediante la expresión del shARN específico generó el efecto opuesto. (Figura 35). Por otra parte, el nivel de

actividad del promotor del gen CYP11A1 en células transfectadas con el plásmido pFLAG vacío o con el plásmido pSUPER.retro-scramble fueron similares.

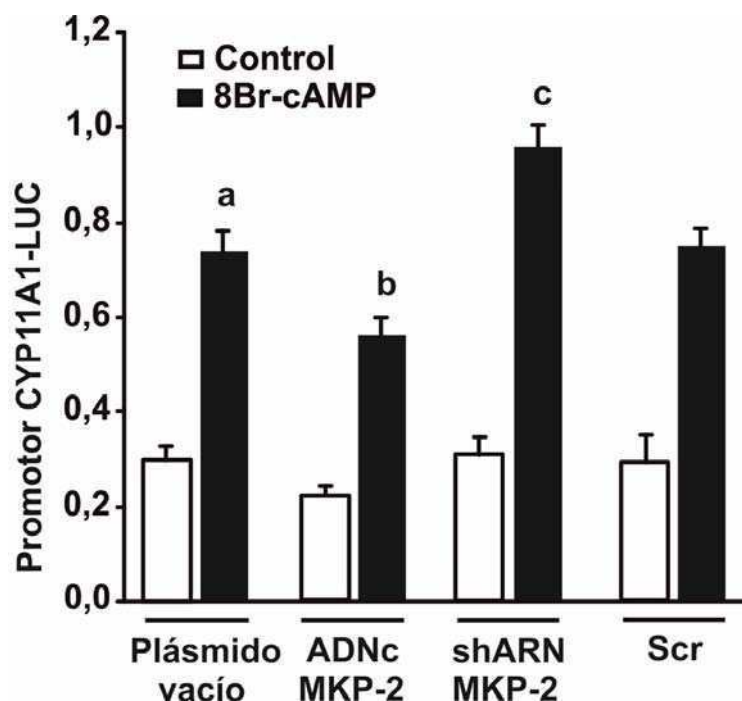


Figura 35. Efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de MKP-2 sobre la actividad del promotor de CYP11A1. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector reportero pGL3-CYP11A1 y el vector control pRL que expresa la luciferasa *Renilla*, junto con el vector control pFLAG (plásmido control), el vector de expresión pFLAG-MKP-2 (ADNc MKP-2), el vector de silenciamiento pSUPER.retro-MKP-2 (shARN MKP-2 A) o el vector control pSUPER.retro-scramble (Scr). Luego de 48 horas, las células fueron estimuladas con 0.5 mM 8Br-cAMP por 12 horas. Luego se detectó la actividad de luciferasa en los lisados celulares. Cada valor fue normalizado contra la actividad de la luciferasa *Renilla*. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. a, $P < 0.001$ vs. células no estimuladas y transfectadas con el plásmido vacío; b, $P < 0.001$ y c, $P < 0.05$ vs. células estimuladas con 8Br-cAMP y transfectadas con el plásmido vacío.

Como era esperado, el efecto de la proteína MKP-2 sobre la actividad del promotor de CYP11A1 también se reflejó en la síntesis del correspondiente ARNm. De hecho, los niveles de ARNm de CYP11A1 obtenidos luego de 12 horas de estimulación con 8Br-cAMP fueron reducidos por la sobre-expresión de MKP-2 e incrementados cuando la expresión de MKP-2 se bloquea por el shARN MKP-2 (Figura 36)

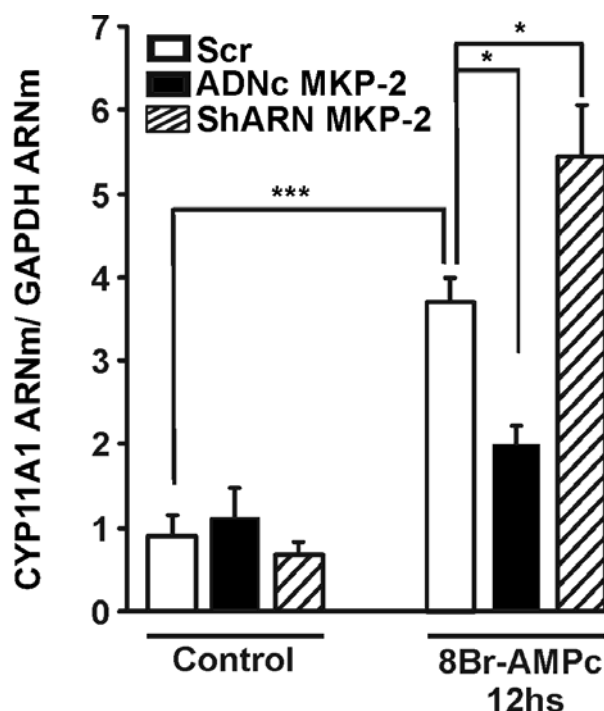


Figura 36. Efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de MKP-2 sobre los niveles del ARNm del CYP11A1. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con el vector reportero pGL3-CYP11A1 y el vector control pRL que expresa la luciferasa *Renilla* junto con el vector de expresión pFLAG-MKP-2 (ADNc MKP-2) o el vector de silenciamiento pSUPER.retro-MKP-2 (shARN MKP-2) o el vector control pSUPER.retro-scramble (Scr). Las células fueron privadas de suero y luego estimuladas con 0.5 mM 8Br-cAMP por 12 horas. Se aisló el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa y PCR en tiempo real con primers específicos para CYP11A1 y GAPDH como control. Los niveles de ARNm DE CYP11A1 fueron normalizados contra los correspondientes niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados son expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

III.4. EFECTO DE MKP-2 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA EN CÉLULAS DE LEYDIG DE LA LÍNEA MA-10

Dado que el bloqueo de la expresión de MKP-2 se traduce en un aumento significativo de la actividad del promotor CYP11A1 y de los niveles del correspondiente ARNm, pensamos que las variaciones en el nivel de MKP-2 podían traducirse también en cambios en los niveles de la proteína correspondiente, la enzima P450_{scc}. Por ende, las variaciones en los niveles de esta enzima afectarían la velocidad de metabolización de su sustrato. En las células de Leydig el esteroide mayoritario que se produce es la progesterona (P4). La P4 se genera por la conversión -mediada por la enzima P450_{scc}- de colesterol a pregnenolona (P5) y la posterior transformación de ésta a P4. Dado que la reacción catalizada por la enzima P450_{scc} es la más lenta de

todas las reacciones enzimáticas que llevan a la síntesis de esteroides, la producción de P4 será una medida proporcional a la actividad de la enzima P450_{scc}. Más aún, como la estimulación hormonal no regula la actividad de esta enzima, se puede decir que la producción de P4 es una medida proporcional a la cantidad de P450_{scc}. Por lo tanto analizamos la producción de P4 en células células transfectadas para variar la expresión de MKP-2 utilizando como sustrato de la enzima P450_{scc} un análogo permeable del colesterol, 22R-OH colesterol. La estrategia de usar un derivado del colesterol que atraviesa fácilmente la membrana mitocondrial se diseñó a fin de delimitar la acción del MKP-2 específicamente a los pasos catalizados por la enzima P450_{scc}. Cuando la síntesis se realiza a partir del colesterol endógeno, la esteroideogénesis involucra otras reacciones que pueden ser afectadas por los niveles de MKP-2, particularmente podría afectar la inducción de StAR. Por otro lado para lograr modificar los niveles de P450_{scc} y poner en evidencia el papel modulador de MKP-2, antes del agregado del 22R-OH colesterol las células transfectadas se estimularon con 8Br-AMPC durante 12 horas. Era esperable que la estimulación aumentara los niveles de la enzima de manera dependiente de ERK1/2 y que en las células con niveles altos de MKP-2 por sobre-expresión este aumento se redujera, contrariamente a lo esperable en las células que tienen bloqueada la expresión de esta fosfatasa. Con estas consideraciones en mente planteamos el siguiente protocolo: Las células transfectadas para la expresión de la secuencia Scr o MKP-2 o shARN se incubaron durante 12 hs con 8Br-AMPC, al término de esta incubación se reemplazó el medio de cultivo –que contenía la P4 producida por estímulo del 8Br-AMPC- por medio fresco, se agregó el derivado del colesterol y se continuó la incubación por dos horas adicionales. Al término de esta incubación se aisló el medio de cultivo para valorar los niveles de P4. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 36. Demostramos que en las células transfectadas con el plásmido que expresa la secuencia Scr la estimulación con 8Br-AMPC lleva a un incremento en la síntesis de P4 a partir del análogo permeable del colesterol, lo cual sugiere que la estimulación lleva a un incremento de la enzima P450_{scc} que da cuenta del aumento en la producción del esteroide. Se demostró además que en las células que sobre-expresan MKP-2 la estimulación previa con 8Br-AMPC no incrementa la síntesis de P4 sostenida a partir del análogo del colesterol, en cambio si lo hace en las células transfectadas para reducir la expresión de MKP-2. Por otra parte, cuando se analizó la producción de P4 en las células estimuladas se comprobó –que con respecto a las células que expresan la secuencia Scr (Scr)– las células que sobre-expresan MKP-2 (MKP-2 ADNc) producen una cantidad de P4 significativamente menor mientras que las células

con reducida expresión de MKP-2 (shARN MKP-2) producen una cantidad mayor de P4 (Figura 37).

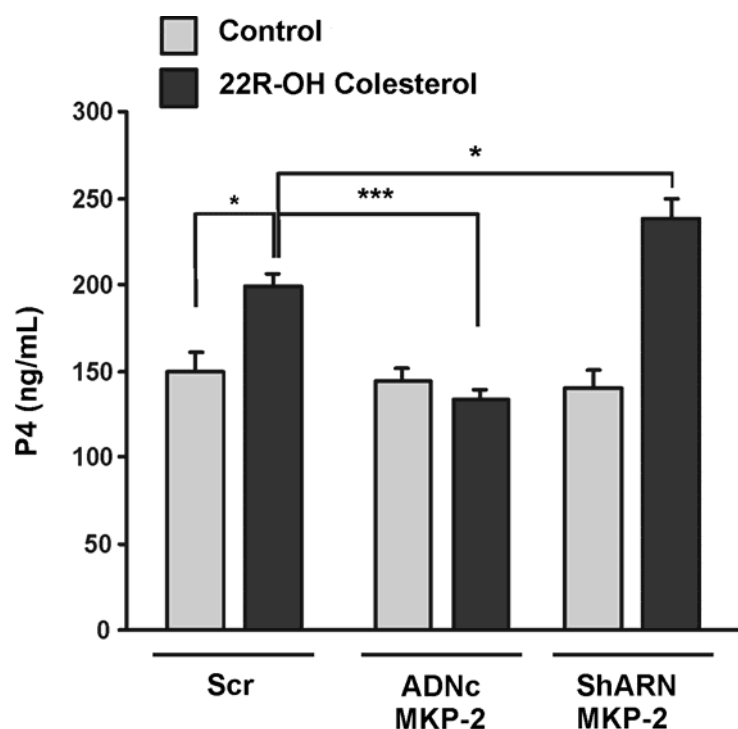


Figura 37. Efecto del bloqueo y de la sobre-expresión de MKP-2 sobre la producción de esteroides en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector reportero junto con el vector de expresión pFLAG-MKP-2 (ADNc MKP-2) o el vector de silenciamiento pSUPER.retro-MKP-2 (shARN MKP-2) o el vector control pSUPER.retro-scramble (Scr). Luego fueron privadas de suero y a continuación estimuladas con 0.5 mM 8Br-cAMP por 12 horas. Luego se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo o no (control) 25 μ M de 22R-OH Colesterol y se prosiguió la incubación por 2 horas. Al término de esta incubación se aisló el medio de cultivo para valorar los niveles de P4. por RIA. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. ***, P<0,001; *, P<0,5. Analizados por ANOVA, seguido del test de Tukey.

Los resultados precedentes indican que la expresión de MKP-2, por su acción sobre la actividad de ERK, es capaz de reducir la expresión del gen CYP11A1 y consecuentemente, los niveles de P450_{scc}. La reducción en los niveles de esta enzima reduce la conversión de P5 a P4, por ende reduce la capacidad de la célula de formar P4.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En células de Leydig el control de la actividad celular, principalmente la biosíntesis de testosterona, es llevada a cabo por la hormona hipofisiaria LH. Aunque numerosos ligandos pueden modular diversas funciones de la célula de Leydig, es LH el principal regulador de la biología de este tipo celular. LH se une a receptores específicos de la membrana celular promoviendo así la activación de la adenilil ciclasa con el consecuente incremento de los niveles del AMPc intracelular y la activación de la PKA. La caracterización de estos eventos como componentes principales de la cascada de señalización de LH en células de Leydig son de larga data (243). El avance de las investigaciones en este tema permite visualizar actualmente un panorama más complejo en el cual participan numerosas moléculas de señalización – como proteínas quinasas- que son reguladas de forma tanto dependiente como independiente de PKA. Un ejemplo de esta intrincada red de moléculas que se activan en respuesta a LH lo constituye la activación de las MAPK del grupo de las ERKs, específicamente ERK1/2 (167). Hirakawa y Ascoli demostraron, mediante diferentes estrategias, que la activación del RLH con hCG promueve la fosforilación de ERK1/2 tanto en células de Leydig de la línea MA-10 como en células de Leydig de rata en cultivos primarios, y que esta activación involucra la acción secuencial de PKA y la proteína G pequeña RAS (167). La activación de miembros de la familia de las MAPK como ERK1/2 también forma parte de la cascada de señalización de ACTH, mecanismo que incluye eventos comunes con la señalización de LH. Trabajos de distintos grupos, incluso del nuestro, han mostrado que la activación de ERK1/2 que gatilla LH o ACTH es un fenómeno de ocurrencia rápida y transitoria (52, 115). La transitoriedad en la activación de ERK1/2 es la característica que conduce al planteo sobre cuál o cuáles son las fosfatasas responsables de la inactivación y cuál es el mecanismo que lleva a la acción programada en el tiempo de esas fosfatasas. Este trabajo de tesis se ha focalizado en este tema y ha llevado a concluir que la inducción de la fosfatasa dual MKP-2 es un evento río abajo de la cascada de señalización de LH que participa en la inactivación de ERK1/2.

El grado de fosforilación de una proteína depende del balance entre las actividades de dos tipos de enzimas: proteínas quinasas y proteínas fosfatasas. La función de las proteínas fosfatasas en los mecanismos de transducción de señales inicialmente se considerada limitada al cierre de la señal. 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 tipos de enzimas, quinasas y fosfatasas, tienen la misma relevancia en los mecanismos en los

cuales participan. Prueba de ello son los numerosos trabajos actuales que muestran evidencias contundentes acerca del rol fundamental que cumplen las fosfatasa en procesos fisiológicos tan diversos como proliferación, diferenciación, apoptosis e inflamación. Más aún, la regulación de la síntesis de esteroides también es un proceso modulado por la acción de fosfatasa. Una serie de trabajos de nuestro grupo han demostrado que tanto las tirosina fosfatasa clásicas o PTP (219, 229) como al menos un miembro de la familia de las fosfatasa duales (115, 221) son reguladas por hormonas esteroidogénicas y participan en la regulación de la síntesis de esteroides.

En este trabajo se demostró que la activación del RLH conduce a la inducción de MKP-2, evento que contribuye a la inactivación de ERK1/2 en la fase terminal de su actividad. Usando dos metodologías diferentes, RT-PCR semicuantitativa o PCR en tiempo real, comprobamos que la estimulación de las células con hCG o con el segundo mensajero correspondiente produce un aumento de aproximadamente 2,5 veces en los niveles del mensajero respecto al control. Este incremento ocurre principalmente a través de la activación de la transcripción y es dependiente de las actividades de PKA y ERK1/2. Aún cuando la estimulación del RLH dispara la activación de Gs y posiblemente de G β , las cuales median la activación de la adenilil ciclasa y de la fosfolipasa C con la consiguiente activación de PKA y PKC respectivamente (161), es poco probable que PKC participe en el incremento del ARNm de MKP-2 por hCG ya que la preincubación de las células con un inhibidor de PKA (H-89) anula el efecto de hCG sobre el ARNm de MKP-2. Por otro lado la preincubación de las células con un inhibidor de MEK también anuló el efecto de hCG, resultado que evidencia la participación de ERK1/2 en la inducción del gen que codifica para MKP-2. De manera similar, la inducción de MKP-2 por la hormona liberadora de gonadotropina, GnRH, es dependiente de MAPK. Se demostró que en gonadotrofos, la inhibición de JNK1/2 o ERK1/2 es suficiente para bloquear la inducción de MKP-2 por GnRH (114). En células de Leydig MA-10 la activación de ERK1/2 por LH/hCG es un evento río debajo de PKA (161). Esta característica, junto con el hecho que el inhibidor de MEK anula la inducción de MKP-2 por hCG, además de evidenciar la participación de ERK1/2 en la activación del gen, sugiere que la acción de PKA en esa inducción es ejercida mayormente a través de ERK1/2. En otras palabras, es poco probable que eventos dependientes PKA e independientes de ERK1/2 participen en la inducción de MKP-2 por hCG.

El análisis de la región promotora del gen que codifica para MKP-2 revela potenciales sitios de unión para los factores de transcripción Sp1, CREB, Elk-1, Egr, de manera similar a lo que ocurre con el gen que codifica para MKP-1 (114). No obstante se requieren mayores estudios para identificar los factores funcionales que

son críticos para la regulación transcripcional del gen. Nuestros resultados sugieren que, al menos en células de Leydig, la activación del gen que codifica para MKP-2 es en gran parte dependiente ERK1/2 e independiente de una acción directa de PKA.

Hemos demostrado que hCG promueve un incremento significativo en los niveles de la proteína MKP-2 luego de 3 hs de estimulación. Este incremento puede atribuirse al aumento en los niveles del ARNm correspondiente. Sin embargo, basados en conocimientos previos, postulamos que el incremento en los niveles de la proteína podía ser atribuido -al menos en parte- a la estabilización de la proteína. Previamente habíamos demostrado que en células de Leydig, hCG promueve la fosforilación y estabilización de MKP-1 (221). Este hecho, sumado a la alta homología de secuencia entre MKP-1 y MKP-2 constituyó el argumento principal para proponer el estudio de la regulación post-traducciona l de MKP-2. Los experimentos realizados con ese fin demostraron que la estimulación de las células, ya sea con hCG u 8Br-AMPC, provoca la acumulación de la quimera flag-MKP-2 pero no de la quimera flag-ERK2, corroborando que la modificación responsable de la acumulación ocurre sobre la porción MKP-2 de la quimera. Como la quimera se expresa bajo un promotor constitutivo, la acumulación de la misma debiera ser consecuencia de una disminución en la velocidad de degradación. Precisamente comprobamos que la estimulación provoca un aumento en la vida media de flag-MKP-2.

Diversos trabajos han demostrado la fosforilación y estabilización de MKP-1. Uno de los primeros trabajos al respecto demostró que la isoforma humana de MKP-1 se fosforila por acción de ERK1/2 en los residuos de Serina 359 y 364 y que esta modificación incrementa la estabilidad de la proteína al impedir su degradación por el proteosoma (116). Incluso la isoforma murina de MKP-1 se estabiliza y fosforila en los mismos sitios de manera dependiente de ERK1/2 (221). Es de destacar que el examen de la secuencia aminoacídica de MKP-2 revele la presencia de los mismos sitios consenso de fosforilación por ERK1/2. En MKP-2 los sitios de fosforilación por ERK1/2 mencionados en relación a MKP-1 corresponden a la Serina 386 y Serina 391 en la isoforma humana y Serina 390 y Serina 395 en la isoforma murina.

La fosforilación y estabilización de MKP-2 fue analizada en células de cáncer de mama. Peng y col. demostraron, mediante el análisis electroforético de los lisados de células MDA-231, que el tratamiento con fosfatasas aumenta la movilidad electroforética de MKP-2. Mediante esta estrategia, que se basa en el hecho que las proteínas fosforiladas exhiben una menor velocidad electroforética que su contraparte desfosforilada, los autores postularon que en las células MDA-231 en cultivo MKP-2 se encuentra fosforilada (123). En base al análisis de la estabilidad y movilidad electroforética de quimeras en sus versiones *wild type* (WT) y mutadas en Serina 386,

en Serina 391 o doblemente mutada, expresadas en células MDA-231, se concluyó que en las células en cultivo en presencia de suero, MKP-2 se encuentra fosforilada en los sitios 386 y 391 y que estas modificaciones impiden la degradación proteosomal de MKP-2 (123).

Los antecedentes mencionados sugieren que hCG/AMPc podría promover la estabilización de la isoforma murina de MKP-2 por fosforilación en Serina 390 y Serina 395, que son los sitios equivalentes a Serina 386 y 391 de la isoforma humana. Sin embargo comprobamos que la preincubación de las células MA-10 con un inhibidor de MEK no evita la acumulación de la quimera flag-MKP-2 inducida por hCG u 8Br-AMPc. Este resultado claramente indica que la actividad de ERK1/2 no participa en la estabilización de MKP-2, por lo tanto podemos decir que en nuestro sistema la fosforilación mediada por ERK1/2 no incrementa la estabilidad de MKP-2. De todas maneras no podemos descartar que en las condiciones ensayadas efectivamente se produzca la fosforilación de la quimera aunque sin consecuencias sobre la estabilidad de la misma.

Los resultados alcanzados en este trabajo muestran que modificaciones post-traduccionales dan cuenta de un incremento en la estabilidad de MKP-2. Determinar cuál/cuales son estas modificaciones fue y es un desafío importante en el desarrollo de este trabajo. Este desafío tiene que ver con el hecho que MKP-2, al igual que MKP-1, presenta numerosos sitios consenso para diferentes modificaciones post-traduccionales, como fosforilación por diferentes quinasas, acetilación e incluso SUMOilación. Por lo tanto el abanico de posibilidades a analizar es muy amplio. Algunas de las potenciales modificaciones han sido comprobadas en ensayos “*in Vitro*”. Por ejemplo en células adrenocorticales de la línea H295R, MKP-1 se fosforila por acción de PKA (222). Sin embargo, la ocurrencia “*in vivo*” de tales modificaciones se limita a la fosforilación por ERK1/2 y a la acetilación. Más aún, de estas modificaciones sólo la fosforilación por ERK1/2 ha sido descrita como mecanismo capaz de alterar la estabilidad de la proteína, tanto en MKP-1 como en MKP-2. La acetilación ha sido descrita en macrófagos, donde LPS dispara la acetilación de MKP-1 en el aminoácido Lisina 57 (isoforma humana), y esta modificación no repercute en la estabilidad de MKP-1 sino en la unión a su sustrato en ese sistema, p38 (126). Aunque este sitio también está presente en MKP-2 (K78 y K82, en la isoforma humana y murina respectivamente) –a nuestro conocimiento– la acetilación en MKP-2 no se ha descrito, aún cuando se ha estudiado en pulmón de ratones que no expresan MKP-2 (-/-) y en macrófagos el papel funcional de MKP-2 ante el desafío con LPS (133).

Mientras que la fosforilación por ERK1/2 de MKP-1 ó MKP-2 se asocia con la estabilidad de la proteína, otros dos sitios consenso de fosforilación por ERK1/2 en MKP-1 se asocian con la inestabilidad de la proteína, dado que la fosforilación en esos sitios promueven la degradación (122). Esos sitios, Serina 296 y Serina 323 en las isoformas humana y murina de MKP-1, también están presentes en MKP-2 y corresponden a la Serina 322 y Serina 349 de la isoforma murina. Estudios de nuestro laboratorio demuestran que, en células de Leydig estimuladas, la forma WT de MKP-1 tiene una vida media de aproximadamente 120 minutos mientras que las doble mutantes S359A-S364A y S296A-S323A tienen vida media más corta (45 minutos) y mas larga respectivamente (>150 minutos) respectivamente (244). Estos resultados sugieren que la estabilización de MKP-1 por estímulo hormonal es el efecto neto de la fosforilación por ERK1/2 en esos cuatro sitios. Si los sitios Serina 322 y Serina 349 en MKP-2 se fosforilan ante el estímulo con hCG y llevan a la inestabilidad de la proteína aún no se conoce. Cabe la posibilidad que la fosforilación ocurra en los sitios de estabilización (Serina 390- Serina 395) y de degradación (Serina 322 y Serina 349) y que la inhibición de MEK impida la fosforilación en estos sitios sin consecuencia neta en la estabilidad de la proteína. Al respecto, cabe comentar el hecho que la probabilidad de fosforilación en Serina 322 y Serina 349 es más alta que en los sitios Serina 390-Serina 395: 0,88 y 0,972 comparado con 0,052 y 0,635 respectivamente (consulta en NetPhos 2.0). Nosotros especulamos que otro/otros sitios, además de los mencionados, pueden contribuir a la estabilidad de MKP-2.

El panorama planteado en cuanto a las modificaciones post- traduccionales que puede experimentar MKP-2 es bastante amplio y analizar cada una de las posibilidades va más allá de lo previsto en el marco de este trabajo. Aún así pensamos que era posible que la estimulación de las células con hCG u 8Br-AMPC promoviera la fosforilación de MKP-2 por PKA. Por lo tanto se hizo una búsqueda (NetPhosK 1.0) con el fin de determinar cuán probable resulta la fosforilación de MKP-2 por PKA. Esta búsqueda indicó que el más alto *score*, 0,77, corresponde a la fosforilación por PKA en la posición Serina 319. Estos antecedentes nos llevaron a obtener la mutante flag-MKP-2-S319A, la cual resultó más lábil que su contraparte, la forma WT. No obstante se requieren mayores estudios para completar la caracterización de la forma WT y en qué grado otras modificaciones contribuyen a la estabilización de MKP-2.

Hemos observado que en condiciones basales, la quimera flag-MKP-2 aún puede detectarse y se ubica preferentemente en el citoplasma. La estimulación favorece la localización de la quimera en el núcleo. MKP-1 exhibe un comportamiento similar, excepto que en condiciones basales la proteína es débilmente detectada (221). Los resultados obtenidos en relación a este tema sugieren que la estimulación

promueve la translocación de la proteína al núcleo como resultado de una modificación post-traducciona.

Numerosos trabajos describen que diferentes modificaciones post-traduccionales pueden regular la localización subcelular de proteínas y generalmente, la función de las mismas. Por ejemplo la proteína SAE2 (**S**UMO **a**ctivation **e**nzyme) la cual participa en la SUMOilación de proteínas, se moviliza entre el núcleo y el citoplasma y su acumulación nuclear depende del agregado de la secuencia SUMO en el extremo C-terminal (245). La acetilación de proteínas es otra modificación post-traducciona que regula la localización subcelular de proteínas. Por ejemplo la enzima Skp2 (**S**-phase **k**inase-**a**sociated **p**rotein 2), uno de las cuatro subunidades del complejo ubiquitin ligasa, se acetila en NLS y esta modificación provoca su retención en el citoplasma. La localización de Skp2 en el citoplasma facilita la ubiquitinación de la proteína E-caderina aumentando así la migración celular (246). La importancia de una correcta localización de proteínas y su relación con la función de las mismas se pone de manifiesto en el hecho que la localización citoplasmática de Skp-2 se asocia con las formas más agresivas de cáncer de mama y próstata (246). Finalmente, la localización subcelular de proteínas también puede ser controlada por mecanismos de fosfo/desfosforilación. Este es el caso de la telomerasa hTERT, su fosforilación por Akt en serina 227 en NLS dirige la proteína al núcleo (247).

En el marco de lo discutido precedentemente cobra importancia lo ya mencionado con respecto a la presencia de las secuencias NLS1 y NLS2, cada una de las cuales es suficiente para la localización de MKP-2 en el núcleo (102). El análisis de la secuencia aminoacídica de la forma murina de MKP-2 indica que el aminoácido Lisina 82 forma parte del motivo NLS1. El residuo equivalente en la forma humana de la proteína homóloga MKP-1, K57, que se acetila en macrófagos en respuesta a LPS (126). Por otra parte, el sitio probable de fosforilación por PKA en la forma murina de MKP-2, S319, forma parte del motivo NLS2. En este contexto puede postularse que estímulos que promueven la acetilación en K82 o la fosforilación en S319 pueden promover la localización nuclear de la proteína. En futuros trabajos de nuestro grupo se planea estudiar en qué medida los sitios mencionados influyen la localización nuclear de MKP-2, para lo cual será necesario obtener, además de la mutante flag-MKP-2-S319A que ya disponemos, la mutante en el sitio de acetilación flag-MKP-2-K82R y la doble mutante flag-MKP-2-S319A-K82R. De comprobarse una hipótesis como la planteada indicaría que el control de la localización subcelular de MKPs es un nivel adicional de regulación de estas enzimas y por ende, de las funciones biológicas asociadas a las mismas.

Otro tema abordado en este trabajo se centró en el rol funcional de MKP-2 en la célula de Leydig bajo estimulación con la correspondiente hormona trófica. En ese contexto la primer pregunta que intentamos resolver fue si existía un sustrato preferencial de MKP-2 en nuestro sistema. Trabajos realizados en tipos celulares diversos y bajo estímulos diferentes muestran que MKP-2 desfosforila a los miembros de las tres subfamilias de MAPKs. Cabe mencionar por ejemplo que LPS induce un rápido incremento en la expresión de MKP-2 en macrófagos de médula ósea de ratones MKP-2 (+/+), efecto que no se observa en ratones MKP-2(-/-). En este último sistema se observó que LPS aumenta y prolonga la fosforilación de JNK1/2 y p38 pero no afecta la fosforilación de ERK1/2 (134). En contraste, en gonadotrofos de la línea α T3-1 la inducción de MKP-2 por GnRH se correlaciona con una inhibición tanto de la fosforilación de ERK1/2 y JNK1/2 como de la expresión de genes dependientes de ERK1/2 y JNK1/2 (134). Como conclusión de lo que surge de la bibliografía, material aquí representado por sólo unos pocos trabajos, se puede inferir que los miembros de los tres subgrupos de MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 y p38) son potenciales sustratos de MKP-2 en nuestro sistema.

Una característica diferencial en MKP-1 y MKP-2 es el tiempo de inducción. MKP-1 es producto de un gen de inducción temprana, por lo tanto la activación del gen se hace evidente a los pocos minutos de iniciada la estimulación (236). En el caso de la inducción de MKP-1 por hCG en células MA-10 los niveles del ARNm de MKP-1 se elevan significativamente luego de 15 minutos de estimulación (221). En contraste, la inducción de MKP-2 exhibe una cinética más lenta. En particular en células MA-10, la estimulación hormonal provoca un incremento significativo de los niveles del ARNm luego de 120 min de estimulación. El hecho que MKP-1 y MKP-2 se inducen a diferentes tiempos sustenta la hipótesis que plantea que ambas enzimas tienen diferente función biológica.

Aportes importantes con respecto al papel funcional de MKP-2 se han logrado mediante el uso de animales manipulados genéticamente para anular la expresión de esta fosfatasa o de cultivos primarios derivados de tejidos de estos animales. Así, en un sistema como este último se demostró que la estimulación de fibroblastos de ratones con PDGF provoca la activación de ERK1/2, la cual es máxima entre los 5 y los 10 min y se prolonga hasta las 24 hs aunque con niveles bajos de fosforilación. Al comparar estos resultados con aquellos obtenidos con fibroblastos de ratones tipo MKP-2(-/-) no se verificaron diferencias significativas a tiempos cortos de estimulación. Sin embargo se observaron niveles mayores de P-ERK1/2 entre las 2 y 24 hs (248). Si tenemos en cuenta que la inducción de MKP-2 se hace significativa después de 2 o 3 horas de estimulación, queda claro que la acción de MKP-2 se limita a la

desfosforilación de ERK1/2 en su última fase de activación. Como se verá seguidamente, estas conclusiones son similares a las alcanzadas en este trabajo.

En el mismo modelo experimental que el mencionado en el párrafo anterior se demostró que la delección de MKP-2 produce cambios menos notables sobre la fosforilación de JNK1/2 y p38 que sobre ERK1/2. En los fibroblastos de ratones WT la droga proapoptótica ansiomicina provoca la activación de JNK y p38 mientras que la delección de MKP-2 incrementa ligeramente la magnitud de la fosforilación de esas quinasas sin modificar la cinética de activación. Aún así se observaron grandes diferencias en parámetros relacionados con la proliferación y resistencia a la apoptosis en fibroblastos de ratones MKP-2(-/-) comparados con los WT (248).

Los antecedentes mencionados con respecto a la función de MKP-2 demuestran que esta enzima tiene roles esenciales y no-redundantes en la proliferación y supervivencia celular. Más aún, estos hallazgos más recientes cambian la visión con respecto a la función biológica de MKP-2 –anteriormente considerada como una mera enzima subrogante de MKP-1– aceptada hasta hace apenas un par de años.

Con respecto al sustrato de MKP-2 en nuestro sistema, células de Leydig estimuladas con hCG u 8Br-AMPC, planteamos dos posibilidades: ERK1/2 y JNK1/2. Una acción de MKP-2 sobre p38 es poco probable ya la activación de esta quinasa generalmente ocurre por estrés o injuria celular. Diferentes trabajos, incluso de nuestro grupo, han demostrado que la estimulación del RLH provoca la activación de ERK1/2 en célula de Leydig. En contraste, la estimulación de JNK1/2 por hCG o LH, aún en concentraciones como para producir máxima esteroidogénesis sin producir daño de las células de Leydig, no está documentada, de acuerdo a nuestras búsquedas. Es más, en este trabajo se analizó exhaustivamente efecto de hCG y 8Br-AMPC sobre la actividad de JNK1/2. La determinación de los niveles de P-JNK1/2 por Western blot no mostró cambios significativos en los niveles de fosforilación de estas quinasas en las diferentes condiciones ensayadas (datos no mostrados).

En contraste a lo que ocurre con dosis fisiológicas de hCG/LH, en células de Leydig provenientes de ratas tratadas con dosis altas y repetidas de hCG se detecta la activación de JNK1/2 (249). Sin embargo, se conoce que este modelo de estimulación hormonal (dosis altas de hormona y estimulación persistente) provoca estrés de retículo endoplásmico y apoptosis de las células de Leydig, efectos que se acompañan con un marcado descenso en la expresión de enzimas esteroidogénicas y en la producción de testosterona (249, 250). Por lo tanto, mientras que en células de Leydig la estimulación persistente con hCG provoca activación de JNK1/2, la estimulación en condiciones que simula un estado fisiológico parece no afectar la actividad de estas quinasas.

Previamente se mencionó que la cascada de señalización de ACTH es similar a la de LH. Sin embargo, se puede mencionar como diferencia la activación de JNK1/2, ya que ACTH produce este efecto. Se demostró que ACTH activa JNK1/2 en células de corteza adrenal de rata estimuladas *in vivo* y en células de la línea Y1 (170). Este trabajo también concluye que la activación de JNK1/2 por ACTH es dependiente de PKC e independiente de PKA y que esta activación estaría vinculada con la expresión de genes relacionados con el estrés. En este contexto es importante mencionar que en células MA-10, la activación de PKC con un ester de forbol lleva a la inducción y fosforilación de c-Jun (195), sustrato preferencial de JNK.

Los antecedentes mencionados restringen a p-ERK1/2 como posible sustrato de MKP-2. Hemos demostrado que en células MA-10 la estimulación con hCG promueve la inducción de MKP-1, cuya acción da cuenta de la desfosforilación de ERK1/2. El análisis de los niveles de p-ERK por Western blot mostró que la desfosforilación, aunque se inicia a los pocos minutos de estimulación (15-30 minutos), no se completa al menos hasta las 3 hs. Este resultado nos indujo a pensar que la inducción de MKP-2 contribuye a la inactivación de ERK1/2. La inducción de MKP-1 y MKP-2 por un mismo estímulo ha sido demostrada en diferentes sistemas, por ejemplo en gonadotrofos y fibroblastos estimulados con GnRH (114) y suero respectivamente (117). Nuestros hallazgos demuestran que LH/hCG es otro estímulo que provoca la inducción de dos MKPs de diferente tiempo de inducción, como para extender el período de desfosforilación. Así MKP-2 actúa en la última fase de actividad de ERK1/2 para completar la desfosforilación que ya inició MKP-1 (221). Los resultados de los experimentos en los que se realizó el bloqueo de la expresión de MKP-2 por expresión de un *shARN*-MKP-2 demostraron que, como se propuso, esta fosfatasa completa la acción de MKP-1 sobre p-ERK.

Nuestro grupo ha demostrado que la inducción de MKP-1 por hCG contribuye a modular la expresión del gen STARD1 (Brion, Endocrinology). La activación de este gen ocurre rápidamente, de modo tal que a partir de los 30 minutos de estimulación el ARNm comienza a ser detectado por RT-PCR (no por Northern blot). Los niveles del ARNm se elevan rápidamente entre las 2 y 4 horas y alcanzan valores máximos a las 6 horas (188). En ese marco temporal también puede ser detectada MKP-1 en células MA-10 bajo el mismo tratamiento, por lo tanto es compatible una modulación de la expresión del gen STARD1 (221) por MKP-1 como ya demostramos. Teniendo en cuenta que los niveles de la proteína MKP-2 se elevan significativamente a las 3 horas, es poco probable que su actividad pueda interferir con la inducción de StAR. Más aún, se ha demostrado que el inhibidor de MEK, PD98059, inhibe la activación del promotor de STARD1 cuando se agrega al medio de cultivo de las células MA-10

durante las 2 horas primeras horas de estimulación, mientras que si se lo agrega después de este tiempo carece de efecto inhibitorio (251).

La búsqueda de un blanco dependiente de ERK1/2 involucrado en la regulación de la célula de Leydig por LH/hCG nos llevó a postular que ese blanco podría ser el gen CYP11A1. La expresión de ese gen cumple 2 requisitos que serían necesarios para que MKP-2 ejerza un efecto modulador: 1) se induce por hCG/AMPc a través de un camino de señalización que incluye la actividad de ERK1/2 (252); 2) ocurre en un marco temporal que es compatible con la regulación por MKP-2, en el sentido que el incremento de los niveles de la proteína MKP-2 se detecta aproximadamente al mismo tiempo que el incremento de los niveles del ARNm correspondiente a CYP11A1 (203). Uno de los primeros trabajos realizados sobre la regulación del gen CYP11A1 en células de Leydig de la línea MA-10 corresponde a Mellon y Vaisse, quienes demostraron que la estimulación con LH, hCG y 8Br-AMPc aumentan los niveles del ARNm correspondiente a P450scc entre 1,5 y 3 veces y que este incremento se hace evidente a partir de las 2 horas y alcanza el valor máximo a las 8 horas (203). Las conclusiones con respecto a la participación de ERK1/2 en la inducción de CYP11A1 provienen de estudios más recientes. Yamashita y col. demostraron la participación de ERK1/2 en la expresión de varios genes relacionados con la esteroidogénesis utilizando como modelo experimental ratones que portan una delección tejido-específica que bloquea la expresión de MEK1/2 y cultivos primarios de células de Leydig provenientes de esos mismos animales (252). Estos autores mostraron que hCG no promueve la activación de ERK1/2 en células de Leydig en cultivo y que los testículos de estos animales exhiben una baja expresión de proteínas relacionadas con la esteroidogénesis, entre ellas P450scc (252). Utilizando el mismo modelo experimental recientemente se demostró que la disminución de los niveles del ARNm correspondiente a P450scc es bien evidente hasta que los animales alcanzan la pubertad y disminuye con la entrada a la adultez (208).

Una evidencia preliminar sobre la participación de ERK1/2 en la activación del gen CYP11A1 proviene de nuestro laboratorio, ya que en el marco de un trabajo de tesis se mostró que la sobre-expresión de una MKP, en este caso MKP-1, reduce la activación del promotor de este gen mientras que un ARN anti-sentido no incrementa significativamente la actividad del mismo (251). Este resultado preliminar sugirió que la expresión de una MKP, diferente a MKP-1, podría iniciar el apagado de la inducción de CYP11A1. Los resultados obtenidos en el curso de este trabajo mostraron que la inhibición de MEK con PD98059 bloquea la activación del promotor de CYP11A1 por 8Br-AMPc. Se demostró además que la expresión de un *shARN* que reduce efectiva y selectivamente la expresión de MKP-2, incrementa la activación de CYP11A1 por 8B-

AMPC y los niveles del ARNm mientras que la sobre-expresión de MKP-2 produce un efecto contrario sobre la actividad del promotor y sobre los niveles del ARNm alcanzados por estimulación con 8Br-AMPC. Estos resultados nos permiten concluir que la inducción de MKP-2 contribuye a apagar la expresión de CYP11A1 que dispara la activación del RLH.

Al plantear, en base a nuestros resultados, que la inducción de MKP-2 funciona para “apagar” la expresión del gen CYP11A1 que se inicia con la activación del RLH, podrían plantearse dos argumentos en contra. Uno de ellos se refiere a la discrepancia entre la magnitud de la inhibición que produce la sobre-expresión de MKP-2 –tanto sobre la activación del promotor como sobre el incremento del ARNm– y la inhibición completa que se logra mediante la exposición de las células al inhibidor PD98059. Al respecto es importante mencionar que la eficiencia de transfección en nuestro sistema es de aproximadamente 40%, valor aproximado a la inhibición que produce la sobre-expresión de MKP-2. El segundo argumento se relaciona con los perfiles temporales de inducción del ARNm correspondiente a P450scc y las variaciones en los niveles de MPK-2 en células MA-10 estimuladas con 8Br-AMPC. Al respecto la pregunta que surge es ¿porqué los niveles del mensajero de P450scc alcanzan el máximo a las 8 horas aún cuando a las 3 horas de estimulación ya se detectan niveles altos de MKP-2? Nuestra hipótesis es que a las 3 horas aproximadamente se inicia la etapa de “apagado” de la expresión del gen CYP11A1, lo cual coincide con una disminución de la velocidad de síntesis del ARNm correspondiente, disminución que se pone en evidencia a partir de las 4 horas de estimulación según el trabajo de Mellon y Vaisse (203). Si bien aquí demostramos que MKP-2 participa en la regulación de la expresión de CYP11A1, no descartamos que la expresión de MKP-1 también tenga una participación en esta regulación. Es probable un solapamiento entre la etapa terminal y la etapa inicial de expresión de MKP-1 y MKP-2 respectivamente que podría causar un solapamiento funcional.

MKP-2 promueve la desfosforilación tardía de ERK1/2, evento que lleva a inactivación de –al menos– una proteína reguladora dependiente de ERK necesaria para la activación del gen CYP11A. La pregunta que surge en relación a esta conclusión se refiere a la identidad de esta proteína reguladora. La regulación del promotor del gen CYP11A1 por gonadotrofinas y AMPC involucra factores de transcripción como SF1, GATA4, CREB-1 y miembros de la familia AP-1 (cFos y c-Jun), y de la familia NR4A como Nur77, aunque el perfil de factores de transcripción que participan es tejido específica (192). Así por ejemplo Nur77 participa en la activación del CYP11A1 en células de Leydig K28 pero tiene poco efecto en el promotor de células de granulosa de origen humano (192).

Con respecto al mecanismo a través del cual MKP-2 regula la inducción de CYP11A1, una posibilidad apunta a SF1. Se sabe que ERK1/2 promueve la fosforilación de SF1 y su actividad sobre la activación de STARD1 (199). Por lo tanto, la inducción de MKP-2 podría promover la desfosforilación de ERK1/2 y consecuentemente, la fosforilación de SF1, reduciendo así su actividad transcripcional sobre CYP11A1. Sin embargo, de acuerdo a nuestras búsquedas bibliográficas, no se conoce el efecto de la fosforilación de SF-1 sobre su capacidad de activar al promotor de CYP11A1. Por otra parte hay estudios que permiten inferir que la fosforilación de SF-1 regula de manera diferencial la capacidad de SF-1 de regular la expresión de diferentes genes. Mientras que la fosforilación de SF-1 aumenta la actividad de SF-1 para activar a STARD1, su desfosforilación –mediada por MKP-1– promueve su activación para dirigir la activación del gen CYP17 (222).

En células arrestadas por depleción de suero, los niveles de Nurr77 se incrementan por diferentes estímulos. En particular en células de Leydig MA-10, el AMPc incrementa la expresión de Nurr77 (253). Se ha descrito la participación de ERK1/2 tanto en la inducción como en la activación de Nurr77. En corticotrofos, CRH y AMPc promueven la inducción y activación de Nurr77 a través de ERK1/2, PKA y calcio (254). También en células de ovario la inducción de Nurr77 por prostaglandinas es un evento dependiente de ERK1/2 (255). Además, se ha descrito la fosforilación *in vivo* de Nur77 en la serina 105 por acción de ERK1/2 (256).

Los genes de expresión temprana de la familia AP-1 participan en la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis (192). En células de Leydig porcinas hCG incrementa la expresión de c-Fos y jun-B pero no la de c-jun (257). En contraste, en células MA-10 expuestas a 8Br-AMPc durante un período comprendido entre 0-240 minutos se observa aumento en los niveles de p-cFos y p-c-Jun. Este último se eleva a partir de los 10 minutos, alcanza un nivel máximo (4,5 veces respecto al control) entre los 15 y 30 minutos y desciende por debajo de los valores controles a los 60 minutos. Dado que los niveles de c-Jun no varían durante el período analizado, se concluye que el aumento en los niveles de p-c-Jun es el resultado de la fosforilación de la proteína –evento que ocurre tempranamente– más de la inducción de la misma (168). Aunque este trabajo demuestra la fosforilación de c-Jun, no se menciona la quinasa involucrada ni se analiza la fosforilación de JNK1/2, inclusive se menciona que diferentes quinasas pueden dar cuenta de la fosforilación de c-jun. Además es importante mencionar que en este trabajo las células MA-10 no se someten a depleción de suero como se procede en nuestros experimentos, lo cual impide hacer una estricta comparación de resultados.

La regulación de la expresión de CYP11A1 en células adrenocorticales de la línea Y1 ha sido extensivamente estudiada por Bon-chu Chung y colaboradores. Este grupo demostró que la expresión basal y estimulada de CYP11A1 requieren de c-Jun y la proteína quinasa HIPK3 (*homeodomain-interacting protein kinase 3*) y que ambas proteínas son necesarias para la actividad de SF-1 sobre la transcripción de CYP11A1(210). Además, en este trabajo se demuestra que la estimulación con AMPc lleva a fosforilación de JNK1/2 y de c-Jun a través de HIPK3. Más específicamente, recientemente se demostró que la conexión entre HIPK3 y JNK1/2 se realiza a través de la quinasa Daxx (*Death-associated Protein 6*) (258). El análisis del perfil temporal de p-c-Jun en células Y1 estimuladas 8Br-AMPc, similar al de P450scc, muestra que la fosforilación de c-Jun ocurre tardíamente, ya que la fosforilación se detecta a las 3 horas de estimulación, alcanza un máximo a las 12 horas y permanece elevada hasta el final del experimento (24 horas) mientras que los niveles de c-Jun no varían en el período 0-24 horas. Los resultados obtenidos en células de Leydig MA-10 y adrenocorticales Y1 muestran notables diferencias en lo que respecta a la variación a lo largo del tiempo de los niveles de p-c-Jun (168, 210). Estas diferencias están de acuerdo con el hecho que la regulación de la expresión CYP11A1 es tejido específica (206). Por otra parte corresponde señalar que a diferencia de nuestros experimentos, que fueron realizados en células depletadas de suero durante 24 horas, los experimentos en células de Leydig y Y1 mencionados en este párrafo –aparentemente– no recibieron ese tratamiento. Estas posibles diferencias pueden modificar notablemente los resultados de los experimentos porque la disponibilidad de factores de transcripción puede variar entre ambas condiciones experimentales. Hecha la salvedad con respecto a diferencias de tejidos y, posiblemente, de condiciones experimentales, nuestros resultados no apoyan un modelo donde MKP-2 participa en la regulación de la expresión de CYP11A1 a través de su acción sobre el sistema JNK1/2 – p-c-Jun. Primero, no detectamos activación de JNK1/2; segundo, aún si hCG/AMPc activara JNK1/2 y lo hiciera con una cinética similar a la fosforilación de c-Jun, eso implicaría que los niveles de p-JNK1/2 se incrementa conforme se incrementan los niveles de MKP-2, lo cual hace improbable la desfosforilación de p-JNK por MKP-2.

Winay y col. demostraron que la expresión del gen que codifica para el receptor de ACTH sigue un perfil cíclico de regulación, donde los ciclos de activación se alternan con períodos de inactivación, los cuales coinciden con la asociación de MKP-1 y SF-1. Aunque meramente especulativo podría postularse que MKP-2 coordina un patrón cíclico similar en la regulación de CYP11A1 (215).

Por todo lo expuesto se concluye que varias proteínas/factores de transcripción dependientes de ERK1/2 participan en la activación del gen CYP11A1. Como la inducción de MKP-2 impacta en la fase terminal de la activación de ERK1/2 y reduce la activación del gen CYP11A1, se infiere que una proteína aún no identificada se fosforila por ERK1/2 en ese período e induce la expresión del mismo.

CONCLUSIONES FINALES

Las MKPs son enzimas involucradas en la desfosforilación de las MAPKs. Dos miembros de esta familia de enzimas son las isoformas nucleares MKP-1 y MKP-2, ambas capaces de desfosforilar a los miembros de las tres subfamilias de MAPK: ERKs, JNKs y p38. La estimulación del RLH en células de Leydig lleva rápidamente a la fosforilación de ERK1/2, efecto que se evidencia a los pocos minutos de iniciada la estimulación. La desfosforilación de ERK1/2 en células de Leydig MA-10 estimuladas con hCG u 8Br-AMPc se inicia aproximadamente a los 15 minutos de estimulación con la inducción de MKP-1 y se concluye pasado un par de horas. El presente trabajo contribuye a caracterizar la desfosforilación de tardía de ERK1/2 y las consecuencias fisiológicas de esa desfosforilación.

Aquí describimos que un estímulo que induce MKP-1, hCG, también induce -aunque más tardíamente- a MKP-2. Esta inducción es dependiente de PKA y se ejerce a diferentes niveles: 1) activación transcripcional, 2) estabilización de la proteína por modificación post-traducciona, 3) localización de la proteína en el núcleo.

Se demuestra que MKP-2 participa en el “apagado” de la actividad de ERK1/2, ya que la desfosforilación de ERK1/2 que inicia MKP-1, se completa con la inducción de MKP-2.

En el aspecto funcional, se concluye que MKP-2 modula la expresión del gen CYP11A1, un gen dependiente de LH/hCG y ERK1/2 e integrante del repertorio de genes involucrados en la síntesis de esteroides y regulados por acción hormonal crónica. Si bien nuestros estudios sugieren que la desfosforilación tardía de ERK1/2 por la acción de MKP-2 impacta en la actividad transcripcional de un factor de transcripción dependiente de ERK1/2 y necesario para la inducción del gen CYP11A1, la identidad de este factor aún no está resuelta. El esquema de la figura 38 ilustra la cascada de eventos que dispara la activación del RLH y que conducen a la inducción de MKP-2 y el mecanismo propuesto para la modulación de la expresión del gen CYP11A1 por esta fosfatasa

Nuestros resultados son consistentes con un modelo en el que genes de diferente cinética de inducción requieren de la actividad de ERK1/2 en diferente marco temporal, lo que implica una acción diferencial de MKP-1 y MKP-2 en la regulación de la

expresión génica. Dada la ubicuidad de los procesos dependientes de MAPKs, nuestros aportes sobre la caracterización de MKPs pueden ser extrapolables a otros sistemas y contribuir a dilucidar otros procesos fisiológicos y/o patológicos relacionados con estas quinasas.

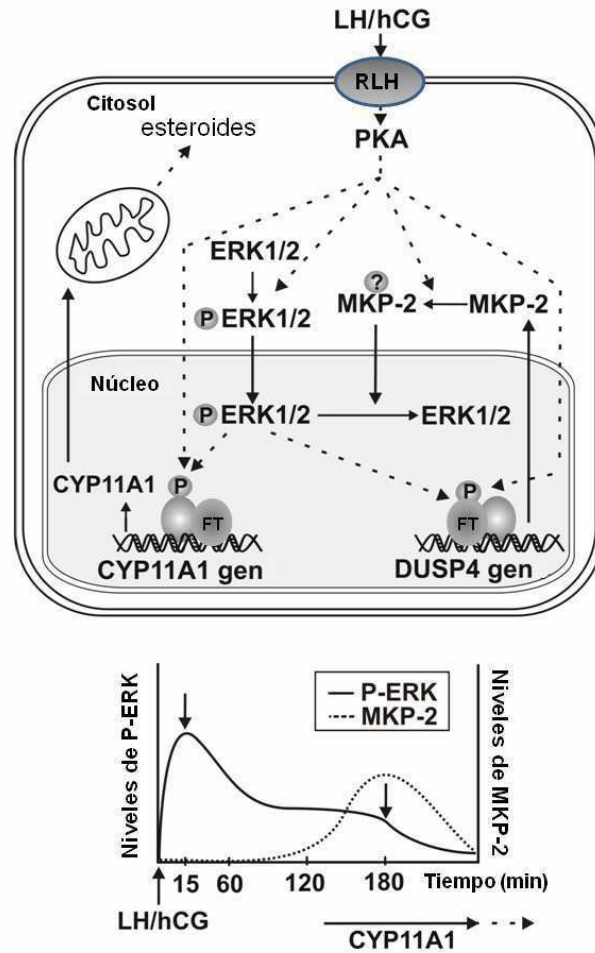


Figura 38. Modelo propuesto para el rol de MKP-2 en la esteroidogénesis. La activación de RLH por LH/hCG gatilla la activación de PKA, la cual lleva a una rápida fosforilación y activación de ERK1/2. ERK activada (P-ERK) se transloca al núcleo donde a su vez fosforila y activa factores de transcripción (FT). Los FT activados por P-ERK, junto con los FT activados por PKA, llevan a la inducción de CYP11A1. El producto que codifica CYP11A1, la proteína P450_{scc}, actúa en la síntesis de esteroides en la mitocondria. Simultáneamente, PKA y P-ERK también inducen la transcripción del gen DUSP4 (que codifica para la proteína MKP-2). PKA también promueve la estabilización de la proteína MKP-2 a través de un mecanismo aún desconocido que lleva a la acumulación de MKP-2 en la célula. A su turno, la proteína MKP-2 induce la desfosforilación de ERK1/2 luego de 180 minutos de estimulación con LH, lo cual genera un mecanismo de retroalimentación negativa en su propia expresión, lo cual contribuye al apagado de eventos dependientes de ERK1/2 involucrados en la esteroidogénesis. Los efectos directos están indicados con líneas sólidas, mientras que los indirectos por líneas punteadas. El signo de interrogación marca una modificación postraduccional desconocida. Los niveles de P-ERK declinan marcadamente entre los 15 y 90 minutos de estimulación hormonal. Entre los 90 y los 180 minutos, los niveles de P-ERK se mantienen constantes. Luego de 180 minutos, ocurre un segundo paso de desfosforilación, debido a la expresión de MKP-2 y los niveles de P-ERK vuelven a los valores basales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB** Large potentials of small heat shock proteins. *Physiological Reviews* 91:1123-1159
2. **Finan JD, Guilak F** The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. *J Cell Biochem* 109:460-467
3. **Kallen CB, Arakane F, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Strauss JF, 3rd** 1998 Unveiling the mechanism of action and regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145:39-45
4. **Dufau ML, Winters CA, Hattori M, Aquilano D, Baranao JL, Nozu K, Baukal A, Catt KJ** 1984 Hormonal regulation of androgen production by the Leydig cell. *Journal of Steroid Biochemistry* 20:161-173
5. **Jurado S, Sanchez-Prieto J, Torres M** 2004 Elements of the nitric oxide/cGMP pathway expressed in cerebellar granule cells: biochemical and functional characterisation. *Neurochem Int* 45:833-843
6. **Kelly MJ, Ronnekleiv OK** 2008 Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology* 290:14-23
7. **Carraway KL, 3rd, Sliwkowski MX, Akita R, Platko JV, Guy PM, Nuijens A, Diamonti AJ, Vandlen RL, Cantley LC, Cerione RA** 1994 The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *The Journal of Biological Chemistry* 269:14303-14306
8. **Schlessinger J, Lemmon MA** 2006 Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring. *Cell* 127:45-48
9. **Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS** 2006 Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366:2-16
10. **Lefkowitz RJ** 2007 Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)* 190:9-19
11. **McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS** 2005 G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62:551-577
12. **Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB** 1994 Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369:621-628
13. **McIntire WE** 2009 Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers. *Neurosignals* 17:82-99
14. **Sugden PH, Clerk A** 1997 Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cellular signalling* 9:337-351
15. **Kiu H, Nicholson SE** 2012 Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* 30:88-106
16. **Shchemelinin I, Sefc L, Necas E** 2006 Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol (Praha)* 52:81-100
17. **Lemmon MA, Schlessinger J** 2010 Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141:1117-1134
18. **Pawson T, Gish GD** 1992 SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71:359-362
19. **Bork P, Margolis B** 1995 A phosphotyrosine interaction domain. *Cell* 80:693-694
20. **Ruff-Jamison S, Chen K, Cohen S** 1995 Epidermal growth factor induces the tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of Stat 5 in mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4215-4218
21. **Vignais L, Nait Oumesmar B, Baron-Van Evercooren AB** 1995 PDGF-alpha receptor is expressed by mature neurones of the central nervous system. *Neuroreport* 6:1993-1996

22. **Kang JS, Liu C, Derynck R** 2009 New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol* 19:385-394
23. **Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN** 2003 The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36:131-149
24. **Langevin HM, Bouffard NA, Badger GJ, Iatridis JC, Howe AK** 2005 Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch ex vivo and in vivo. *American Journal of Physiology* 288:C747-756
25. **Sedej S, Rose T, Rupnik M** 2005 cAMP increases Ca²⁺-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices. *J Physiol* 567:799-813
26. **Shaikh D, Zhou Q, Chen T, Ibe JC, Raj JU, Zhou G** 2012 cAMP-dependent protein kinase is essential for hypoxia-mediated epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion in lung cancer cells. *Cellular Signalling* 24:2396-2406
27. **Donini CF, Di Zazzo E, Zuchegna C, Di Domenico M, D'Inzeo S, Nicolussi A, Avvedimento EV, Coppa A, Porcellini A** 2012 The p85alpha regulatory subunit of PI3K mediates cAMP-PKA and retinoic acid biological effects on MCF7 cell growth and migration. *Int J Oncol* 40:1627-1635
28. **Vandesquille M, Baudonnat M, Decorte L, Louis C, Lestage P, Beracochea D** 2012 Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal alpha4beta2*-nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiol Aging* 34:1599-1609
29. **Shen Y, Fu WY, Cheng EY, Fu AK, Ip NY** 2013 Melanocortin-4 receptor regulates hippocampal synaptic plasticity through a protein kinase A-dependent mechanism. *J Neurosci* 33:464-472
30. **Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP** Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:646-658
31. **Smith FD, Scott JD** 2006 Anchored cAMP signaling: onward and upward - a short history of compartmentalized cAMP signal transduction. *Eur J Cell Biol* 85:585-592
32. **Jarnaess E, Tasken K** 2007 Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans* 35:931-937
33. **Roux PP, Blenis J** 2004 ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320-344
34. **Schaeffer HJ, Weber MJ** 1999 Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19:2435-2444
35. **Raman M, Chen W, Cobb MH** 2007 Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112
36. **Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD** 1991 ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675
37. **Meloche S, Pouyssegur J** 2007 The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26:3227-3239
38. **Ip YT, Davis RJ** 1998 Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205-219
39. **Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ** 1996 Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* 15:2760-2770
40. **Ashwell JD** 2006 The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6:532-540

41. **Obata T, Brown GE, Yaffe MB** 2000 MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 28:N67-77
42. **Abraham E** 2005 Alterations in cell signaling in sepsis. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7:S459-464
43. **Kyriakis JM, Avruch J** 1996 Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18:567-577
44. **Tanoue T, Nishida E** 2002 Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* 93:193-202
45. **Kolch W** 2000 Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical Journal* 351 Pt 2:289-305
46. **Therrien M, Michaud NR, Rubin GM, Morrison DK** 1996 KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev* 10:2684-2695
47. **Morrison DK** 2001 KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *Journal of Cell Science* 114:1609-1612
48. **Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ** 1998 MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science (New York, NY)* 281:1668-1671
49. **Teis D, Wunderlich W, Huber LA** 2002 Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell* 3:803-814
50. **Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL** 2003 Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nature Cell Biology* 5:1104-1110
51. **Schoorlemmer J, Goldfarb M** 2002 Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:49111-49119
52. **Poderoso C, Converso DP, Maloberti P, Duarte A, Neuman I, Galli S, Cornejo Maciel F, Paz C, Carreras MC, Poderoso JJ, Podesta EJ** 2008 A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PloS One* 3:e1443
53. **Mumby MC, Walter G** 1993 Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiological reviews* 73:673-699
54. **Soulsby M, Bennett AM** 2009 Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases. *Physiology (Bethesda)* 24:281-289
55. **Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ** 2009 Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *The Biochemical Journal* 418:475-489
56. **Cohen PT** 2002 Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *Journal of Cell Science* 115:241-256
57. **Barford D** 1996 Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences* 21:407-412
58. **Virshup DM, Shenolikar S** 2009 From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Molecular Cell* 33:537-545
59. **Brady MJ, Saltiel AR** 2001 The role of protein phosphatase-1 in insulin action. *Recent Prog Horm Res* 56:157-173
60. **Berndt N** 1999 Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number. *Front Biosci* 4:D22-42
61. **Morfini G, Szebenyi G, Brown H, Pant HC, Pigino G, DeBoer S, Beffert U, Brady ST** 2004 A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *Embo J* 23:2235-2245

62. **Bridges D, MacDonald JA, Wadzinski B, Moorhead GB** 2006 Identification and characterization of D-AKAP1 as a major adipocyte PKA and PP1 binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346:351-357
63. **Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI** 2006 Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol* 18:623-631
64. **Chen W, Possemato R, Campbell KT, Plattner CA, Pallas DC, Hahn WC** 2004 Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell* 5:127-136
65. **Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A** 1993 The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 365:352-355
66. **Janssens V, Goris J** 2001 Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical Journal* 353:417-439
67. **Ragolia L, Begum N** 1998 Protein phosphatase-1 and insulin action. *Molecular and Cellular Biochemistry* 182:49-58
68. **Xie H, Clarke S** 1994 Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain. *The Journal of Biological Chemistry* 269:1981-1984
69. **Charbonneau H, Tonks NK** 1992 1002 protein phosphatases? *Annu Rev Cell Biol* 8:463-493
70. **Stoker AW** 2005 Protein tyrosine phosphatases and signalling. *The Journal of Endocrinology* 185:19-33
71. **Tonks NK** 2006 Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:833-846
72. **Hardy S, Julien SG, Tremblay ML** 2012 Impact of oncogenic protein tyrosine phosphatases in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 12:4-18
73. **Dickinson RJ, Keyse SM** 2006 Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of Cell Science* 119:4607-4615
74. **Camps M, Nichols A, Arkininstall S** 2000 Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J* 14:6-16
75. **Garton AJ, Tonks NK** 1994 PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *Embo J* 13:3763-3771
76. **Wang J, Bixby JL** 1999 Receptor tyrosine phosphatase-delta is a homophilic, neurite-promoting cell adhesion molecular for CNS neurons. *Mol Cell Neurosci* 14:370-384
77. **Tao J, Malbon CC, Wang HY** 2001 Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 276:29520-29525
78. **Uchida T, Matozaki T, Noguchi T, Yamao T, Horita K, Suzuki T, Fujioka Y, Sakamoto C, Kasuga M** 1994 Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *The Journal of Biological Chemistry* 269:12220-12228
79. **Seely BL, Staubs PA, Reichart DR, Berhanu P, Milarski KL, Saltiel AR, Kusari J, Olefsky JM** 1996 Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes* 45:1379-1385
80. **Bandyopadhyay D, Kusari A, Kenner KA, Liu F, Chernoff J, Gustafson TA, Kusari J** 1997 Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *The Journal of Biological Chemistry* 272:1639-1645
81. **Flint AJ, Gebbink MF, Franza BR, Jr., Hill DE, Tonks NK** 1993 Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *Embo J* 12:1937-1946

82. **Chen J, Parsons S, Brautigan DL** 1994 Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 269:7957-7962
83. **Ali S, Ali S** 2000 Recruitment of the protein-tyrosine phosphatase SHP-2 to the C-terminal tyrosine of the prolactin receptor and to the adaptor protein Gab2. *The Journal of Biological Chemistry* 275:39073-39080
84. **Rocchi S, Gaillard I, van Obberghen E, Chambaz EM, Vilgrain I** 2000 Adrenocorticotrophic hormone stimulates phosphotyrosine phosphatase SHP2 in bovine adrenocortical cells: phosphorylation and activation by cAMP-dependent protein kinase. *The Biochemical Journal* 352 Pt 2:483-490
85. **Gorostizaga A** 2008 Caracterización Bioquímica de Tirosina Fosfatasa de Tejidos Esteroidogénicos. In: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires
86. **Rhee SH, Jones BW, Toshchakov V, Vogel SN, Fenton MJ** 2003 Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 278:22506-22512
87. **Bilwes AM, den Hertog J, Hunter T, Noel JP** 1996 Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature* 382:555-559
88. **Caunt CJ, Keyse SM** 2013 Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *Febs J* 280:489-504
89. **Huang CY, Tan TH** 2012 DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell Biosci* 2:24
90. **Keyse SM, Emslie EA** 1992 Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* 359:644-647
91. **Rohan PJ, Davis P, Moskaluk CA, Kearns M, Krutzsch H, Siebenlist U, Kelly K** 1993 PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science (New York, NY)* 259:1763-1766
92. **Groom LA, Sneddon AA, Alessi DR, Dowd S, Keyse SM** 1996 Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J* 15:3621-3632
93. **Dowd S, Sneddon AA, Keyse SM** 1998 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. *Journal of Cell Science* 111 (Pt 22):3389-3399
94. **Tanoue T, Yamamoto T, Maeda R, Nishida E** 2001 A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *The Journal of Biological Chemistry* 276:26629-26639
95. **Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E** 2000 A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* 2:110-116
96. **Tanoue T, Yamamoto T, Nishida E** 2002 Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry* 277:22942-22949
97. **Castelli M, Camps M, Gillieron C, Leroy D, Arkinstall S, Rommel C, Nichols A** 2004 MAP kinase phosphatase 3 (MKP3) interacts with and is phosphorylated by protein kinase CK2alpha. *The Journal of Biological Chemistry* 279:44731-44739
98. **Farooq A, Plotnikova O, Chaturvedi G, Yan S, Zeng L, Zhang Q, Zhou MM** 2003 Solution structure of the MAPK phosphatase PAC-1 catalytic domain. Insights into substrate-induced enzymatic activation of MKP. *Structure* 11:155-164
99. **Zhou B, Wu L, Shen K, Zhang J, Lawrence DS, Zhang ZY** 2001 Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2. *The Journal of Biological Chemistry* 276:6506-6515

100. **Kawajiri K, Ikuta T, Suzuki T, Kusaka M, Muramatsu M, Fujieda K, Tachibana M, Morohashi K** 2003 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). *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md 17:994-1004
101. **Wu JJ, Zhang L, Bennett AM** 2005 The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. *Molecular and Cellular Biology* 25:4792-4803
102. **Sloss CM, Cadalbert L, Finn SG, Fuller SJ, Plevin R** 2005 Disruption of two putative nuclear localization sequences is required for cytosolic localization of mitogen-activated protein kinase phosphatase-2. *Cellular Signalling* 17:709-716
103. **Bardwell AJ, Abdollahi M, Bardwell L** 2003 Docking sites on mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases, MAPK phosphatases and the Elk-1 transcription factor compete for MAPK binding and are crucial for enzymic activity. *The Biochemical Journal* 370:1077-1085
104. **Karlsson M, Mathers J, Dickinson RJ, Mandl M, Keyse SM** 2004 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. *The Journal of Biological Chemistry* 279:41882-41891
105. **Wishart MJ, Dixon JE** 1998 Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends in Biochemical Sciences* 23:301-306
106. **Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, Owens DM, Keenan ID, Dickinson RJ, Storey KG, Keyse SM** 2008 Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *The Biochemical Journal* 412:287-298
107. **Kucharska A, Rushworth LK, Staples C, Morrice NA, Keyse SM** 2009 Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cellular Signalling* 21:1794-1805
108. **Bhalla US, Ram PT, Iyengar R** 2002 MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science* (New York, NY 297:1018-1023
109. **Camps M, Chabert C, Muda M, Boschert U, Gillieron C, Arkinstall S** 1998 Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. *FEBS Letters* 425:271-276
110. **Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM** 2001 Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *The Journal of Biological Chemistry* 276:16491-16500
111. **Wang J, Shen WH, Jin YJ, Brandt-Rauf PW, Yin Y** 2007 A molecular link between E2F-1 and the MAPK cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 282:18521-18531
112. **Edwards L, Ernsberger P** 2003 The I(1)-imidazoline receptor in PC12 pheochromocytoma cells reverses NGF-induced ERK activation and induces MKP-2 phosphatase. *Brain Research* 980:71-79
113. **Torres C, Francis MK, Lorenzini A, Tresini M, Cristofalo VJ** 2003 Metabolic stabilization of MAP kinase phosphatase-2 in senescence of human fibroblasts. *Experimental Cell Research* 290:195-206
114. **Zhang T, Mulvaney JM, Roberson MS** 2001 Activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 by gonadotropin-releasing hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 172:79-89
115. **Bey P, Gorostizaga AB, Maloberti PM, Lozano RC, Poderoso C, Cornejo Maciel F, Podesta EJ, Paz C** 2003 Adrenocorticotropin induces mitogen-

- activated protein kinase phosphatase 1 in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Endocrinology* 144:1399-1406
116. **Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR** 1999 Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science (New York, NY)* 286:2514-2517
117. **Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR** 1997 The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 272:1368-1376
118. **Camps M, Nichols A, Gillieron C, Antonsson B, Muda M, Chabert C, Boschert U, Arkinstall S** 1998 Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, NY)* 280:1262-1265
119. **Roberson MS, Bliss SP, Xie J, Navratil AM, Farmerie TA, Wolfe MW, Clay CM** 2005 Gonadotropin-releasing hormone induction of extracellular-signal regulated kinase is blocked by inhibition of calmodulin. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)* 19:2412-2423
120. **Teng CH, Huang WN, Meng TC** 2007 Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 282:28395-28407
121. **Choi BH, Hur EM, Lee JH, Jun DJ, Kim KT** 2006 Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *Journal of Cell Science* 119:1329-1340
122. **Lin YW, Yang JL** 2006 Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 281:915-926
123. **Peng DJ, Zhou JY, Wu GS** 2010 Post-translational regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-2 (MKP-2) by ERK. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)* 9:4650-4655
124. **Marchetti S, Gimond C, Chambard JC, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J, Pages G** 2005 Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Molecular and Cellular Biology* 25:854-864
125. **Mori Sequeiros Garcia M, Gomez NV, Gorostizaga A, Acquier A, Gonzalez-Calvar SI, Mendez CF, Paz C** 2013 MAP kinase phosphatase-3 (MKP-3) is transcriptionally and post-translationally up-regulated by hCG and modulates cAMP-induced p21 expression in MA-10 Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 371:174-181
126. **Cao W, Bao C, Padalko E, Lowenstein CJ** 2008 Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. *The Journal of Experimental Medicine* 205:1491-1503
127. **Sanchez-Perez I, Martinez-Gomariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R** 2000 CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 19:5142-5152
128. **Small GW, Shi YY, Edmund NA, Somasundaram S, Moore DT, Orlowski RZ** 2004 Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Molecular Pharmacology* 66:1478-1490
129. **Franklin CC, Srikanth S, Kraft AS** 1998 Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3014-3019

130. **Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR** 1998 DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Molecular cell* 1:543-551
131. **Wu JJ, Bennett AM** 2005 Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 280:16461-16466
132. **Li L, Chen SF, Liu Y** 2009 MAP kinase phosphatase-1, a critical negative regulator of the innate immune response. *International journal of clinical and experimental medicine* 2:48-67
133. **Cornell TT, Rodenhouse P, Cai Q, Sun L, Shanley TP** 2010 Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates the inflammatory response in sepsis. *Infection and Immunity* 78:2868-2876
134. **Al-Mutairi MS, Cadalbert LC, McGachy HA, Shweash M, Schroeder J, Kurnik M, Sloss CM, Bryant CE, Alexander J, Plevin R** 2010 MAP kinase phosphatase-2 plays a critical role in response to infection by *Leishmania mexicana*. *PLoS Pathogens* 6:e1001192
135. **Keyse SM** 2008 Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Reviews* 27:253-261
136. **Sieben NL, Oosting J, Flanagan AM, Prat J, Roemen GM, Kolkman-Uljee SM, van Eijk R, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, van Engeland M** 2005 Differential gene expression in ovarian tumors reveals Dusp 4 and Serpina 5 as key regulators for benign behavior of serous borderline tumors. *J Clin Oncol* 23:7257-7264
137. **Yip-Schneider MT, Lin A, Marshall MS** 2001 Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280:992-997
138. **Wang HY, Cheng Z, Malbon CC** 2003 Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Letters* 191:229-237
139. **Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Belda-Iniesta C, Moratilla C, Cejas P, Fresno-Vara JA, de Castro-Carpeno J, Casado E, Nistal M, Gonzalez-Baron M, Perona R** 2006 MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 25:3335-3345
140. **Hirsch DD, Stork PJ** 1997 Mitogen-activated protein kinase phosphatases inactivate stress-activated protein kinase pathways in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 272:4568-4575
141. **Fuller SJ, Davies EL, Gillespie-Brown J, Sun H, Tonks NK** 1997 Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac myocytes. *The Biochemical Journal* 323 (Pt 2):313-319
142. **Schliess F, Kurz AK, Haussinger D** 2000 Glucagon-induced expression of the MAP kinase phosphatase MKP-1 in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 118:929-936
143. **Kovanen PT, Goldstein JL, Chappell DA, Brown MS** 1980 Regulation of low density lipoprotein receptors by adrenocorticotropin in the adrenal gland of mice and rats in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 255:5591-5598
144. **Gwynne JT, Mahaffee DD** 1989 Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. *The Journal of Biological Chemistry* 264:8141-8150
145. **Simpson ER, Boyd GS** 1966 The cholesterol side-chain cleavage system of the adrenal cortex: a mixed-function oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 24:10-17

146. **Lambeth JD, Xu XX, Glover M** 1987 Cholesterol sulfate inhibits adrenal mitochondrial cholesterol side chain cleavage at a site distinct from cytochrome P-450_{scc}. Evidence for an intramitochondrial cholesterol translocator. *The Journal of Biological Chemistry* 262:9181-9188
147. **van der Vusse GJ, Kalkman ML, van der Molen HJ** 1974 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat testis tissue. Inter- and subcellular localization and inhibition by cyanoketone and nagarse. *Biochimica et Biophysica Acta* 348:404-414
148. **Fawcett DW** 1975 Gametogenesis in the male: prospects for its control. The symposium / The Society for Developmental Biology Society for Developmental Biology:25-53
149. **Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG** 1987 Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews* 8:1-28
150. **Scholer D, Birkhauser M, Peytremann A, Riondel AM, Vallotton MB, Muller AF** 1973 Response of plasma aldosterone to angiotensin II, ACTH and potassium in man. *Acta Endocrinologica* 72:293-307
151. **Fraser R, Brown JJ, Lever AF, Mason PA, Robertson JI** 1979 Control of aldosterone secretion. *Clin Sci (Lond)* 56:389-399
152. **Spat A, Hunyady L** 2004 Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiological Reviews* 84:489-539
153. **Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A** 2008 Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 19:300-307
154. **Dietschy JM, Turley SD** 2001 Cholesterol metabolism in the brain. *Current Opinion in Lipidology* 12:105-112
155. **Steckelbroeck S, Watzka M, Stoffel-Wagner B, Hans VH, Redel L, Clusmann H, Elger CE, Bidlingmaier F, Klingmuller D** 2001 Expression of the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 mRNA in the human brain. *Molecular and Cellular Endocrinology* 171:165-168
156. **Eipper BA, Mains RE, Guenzi D** 1976 High molecular weight forms of adrenocorticotrophic hormone are glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 251:4121-4126
157. **Podesta EJ, Dufau ML, Catt KJ** 1978 Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase of rat Leydig cells: physical characteristics of two holoenzymes and their subunits. *Biochemistry* 17:1566-1573
158. **Rae PA, Gutmann NS, Tsao J, Schimmer BP** 1979 Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:1896-1900
159. **Pon LA, Hartigan JA, Orme-Johnson NR** 1986 Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 261:13309-13316
160. **Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR** 2005 Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)* 19:2647-2659
161. **Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL** 2002 The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine Reviews* 23:141-174
162. **Forti FL, Dias MH, Armelin HA** 2006 ACTH receptor: ectopic expression, activity and signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry* 293:147-160
163. **Vilgrain I, Defaye G, Chambaz EM** 1984 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). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 125:554-561

164. **Carsia RV, Moyle WR, Wolff DJ, Malamed S** 1982 Acute inhibition of corticosteroidogenesis by inhibitors of calmodulin action. *Endocrinology* 111:1456-1461
165. **Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE** 2012 Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Molecular and Cellular Endocrinology* 350:151-162
166. **Ascoli M** 1981 Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 108:88-95
167. **Hirakawa T, Ascoli M** 2003 The lutropin/choriogonadotropin receptor-induced phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases in leydig cells is mediated by a protein kinase a-dependent activation of ras. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)* 17:2189-2200
168. **Manna PR, Jo Y, Stocco DM** 2007 Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *The Journal of Endocrinology* 193:53-63
169. **Schimmer BP** 1979 Adrenocortical Y1 cells. *Methods Enzymol* 58:570-574
170. **Watanabe G, Pena P, Albanese C, Wilsbacher LD, Young JB, Pestell RG** 1997 Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 272:20063-20069
171. **Le T, Schimmer BP** 2001 The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Endocrinology* 142:4282-4287
172. **Otis M, Gallo-Payet N** 2007 Role of MAPKs in angiotensin II-induced steroidogenesis in rat glomerulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 265-266:126-130
173. **Min LJ, Mogi M, Iwai M, Horiuchi M** 2009 Signaling mechanisms of angiotensin II in regulating vascular senescence. *Ageing Research Reviews* 8:113-121
174. **Xiao L, Haack KK, Zucker IH** 2013 Angiotensin II regulates ACE and ACE2 in neurons through p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling. *American Journal of Physiology*
175. **Simpson ER, Lund J, Ahlgren R, Waterman MR** 1990 Regulation by cyclic AMP of the genes encoding steroidogenic enzymes: when the light finally shines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 70:C25-28
176. **Koritz SB, Kumar AM** 1970 On the mechanism of action of the adrenocorticotrophic hormone. The stimulation of the activity of enzymes involved in pregnenolone synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 245:152-159
177. **Jefcoate CR, DiBartolomeis MJ, Williams CA, McNamara BC** 1987 ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. *Journal of Steroid Biochemistry* 27:721-729
178. **Karaboyas GC, Koritz SB** 1965 The Transformation of Delta-5-Pregnenolone and Progesterone to Cortisol by Rat Adrenal Slices and the Effect of Acth and Adenosine 3',5'-Monophosphate Upon It. *Biochimica et Biophysica Acta* 100:600-602
179. **Tuckey RC** 1992 Cholesterol side-chain cleavage by mitochondria from the human placenta. Studies using hydroxycholesterols as substrates. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 42:883-890
180. **Papadopoulos V, Liu J, Culty M** 2007 Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import? *Molecular and Cellular Endocrinology* 265-266:59-64
181. **Anholt RR, De Souza EB, Oster-Granite ML, Snyder SH** 1985 Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 233:517-526

182. **McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH** 1992 Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:3170-3174
183. **Bovolin P, Schlichting J, Miyata M, Ferrarese C, Guidotti A, Alho H** 1990 Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. *Regulatory Peptides* 29:267-281
184. **Papadopoulos V, Brown AS** 1995 Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53:103-110
185. **Batarseh A, Papadopoulos V** 2010 Regulation of translocator protein 18 kDa (TSPO) expression in health and disease states. *Molecular and Cellular Endocrinology* 327:1-12
186. **Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM** 1994 The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *The Journal of Biological Chemistry* 269:28314-28322
187. **Artemenko IP, Zhao D, Hales DB, Hales KH, Jefcoate CR** 2001 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. *The Journal of Biological Chemistry* 276:46583-46596
188. **Clark BJ, Stocco DM** 1997 Steroidogenic acute regulatory protein: the StAR still shines brightly. *Molecular and Cellular Endocrinology* 134:1-8
189. **Lin D, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL** 1995 Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science (New York, NY)* 267:1828-1831
190. **Bose HS, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Miller WL** 1996 The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia. *The New England Journal of Medicine* 335:1870-1878
191. **Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL** 1997 Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:11540-11545
192. **Lavoie HA, King SR** 2009 Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, NJ) 234:880-907
193. **Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM** 1995 Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md) 9:1346-1355
194. **Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, Clark BJ, Lalli E, Sassone-Corsi P, Zeleznik AJ, Stocco DM** 2002 Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md) 16:184-199
195. **Manna PR, Chandrala SP, Jo Y, Stocco DM** 2006 cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *Journal of Molecular Endocrinology* 37:81-95
196. **Manna PR, Stocco DM** 2005 Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression: functional and physiological consequences. *Current Drug Targets* 5:93-108
197. **Sugawara T, Lin D, Holt JA, Martin KO, Javitt NB, Miller WL, Strauss JF, 3rd** 1995 Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR)

- gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry* 34:12506-12512
198. **Castillo AF, Fan J, Papadopoulos V, Podesta EJ** 2011 Hormone-dependent expression of a steroidogenic acute regulatory protein natural antisense transcript in MA-10 mouse tumor Leydig cells. *PLoS One* 6:e22822
 199. **Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM** 2001 ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. *The Journal of Biological Chemistry* 276:34888-34895
 200. **Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss JF, 3rd** 1997 Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *The Journal of Biological Chemistry* 272:32656-32662
 201. **Bhangoo A, Anhalt H, Ten S, King SR** 2006 Phenotypic variations in lipid congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Endocrinol Rev* 3:258-271
 202. **Guo IC, Hu MC, Chung BC** 2003 Transcriptional regulation of CYP11A1. *Journal of Biomedical Science* 10:593-598
 203. **Mellon SH, Vaisse C** 1989 cAMP regulates P450scc gene expression by a cycloheximide-insensitive mechanism in cultured mouse Leydig MA-10 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:7775-7779
 204. **Hum DW, Staels B, Black SM, Miller WL** 1993 Basal transcriptional activity and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsiveness of the human cytochrome P450scc promoter transfected into MA-10 Leydig cells. *Endocrinology* 132:546-552
 205. **Hu MC, Hsu NC, Pai CI, Wang CK, Chung B** 2001 Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)* 15:812-818
 206. **Shih MC, Chiu YN, Hu MC, Guo IC, Chung BC** 2011 Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology* 336:80-84
 207. **King SR, LaVoie HA** 2012 Gonadal transactivation of STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Front Biosci* 17:824-846
 208. **Matzkin ME, Yamashita S, Ascoli M** 2013 The ERK1/2 pathway regulates testosterone synthesis by coordinately regulating the expression of steroidogenic genes in Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 370:130-137
 209. **Denner L, Bodenbun YH, Jiang J, Pages G, Urban RJ** 2010 Insulin-like growth factor-I activates extracellularly regulated kinase to regulate the p450 side-chain cleavage insulin-like response element in granulosa cells. *Endocrinology* 151:2819-2825
 210. **Lan HC, Li HJ, Lin G, Lai PY, Chung BC** 2007 Cyclic AMP stimulates SF-1-dependent CYP11A1 expression through homeodomain-interacting protein kinase 3-mediated Jun N-terminal kinase and c-Jun phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 27:2027-2036
 211. **Iyer RB, Chauhan A, Koritz SB** 1988 The stimulation by adrenocorticotropin of the phosphorylation of adrenal inhibitor-1: a possible role in steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 60:61-69
 212. **Jones PM, Sayed SB, Persaud SJ, Burns CJ, Gyles S, Whitehouse BJ** 2000 Cyclic AMP-induced expression of steroidogenic acute regulatory protein is dependent upon phosphoprotein phosphatase activities. *Journal of Molecular Endocrinology* 24:233-239

213. **Sayed SB, Whitehouse BJ, Jones PM** 1997 Phosphoserine/threonine phosphatases in the rat adrenal cortex: a role in the control of steroidogenesis? *The Journal of Endocrinology* 154:449-458
214. **Poderoso C, Paz C, Gorostizaga A, Cornejo Maciel F, Mendez CF, Podesta EJ** 2002 Protein serine/threonine phosphatase 2A activity is inhibited by cAMP in MA-10 cells. *Endocrine Research* 28:319-323
215. **Winnay JN, Hammer GD** 2006 Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md 20:147-166
216. **Han JD, Rubin CS** 1996 Regulation of cytoskeleton organization and paxillin dephosphorylation by cAMP. *Studies on murine Y1 adrenal cells. The Journal of Biological Chemistry* 271:29211-29215
217. **Vilgrain I, Chinn A, Gaillard I, Chambaz EM, Feige JJ** 1998 Hormonal regulation of focal adhesions in bovine adrenocortical cells: induction of paxillin dephosphorylation by adrenocorticotrophic hormone. *The Biochemical Journal* 332 (Pt 2):533-540
218. **Paz C, Cornejo Maciel F, Mendez C, Podesta EJ** 1999 Corticotropin increases protein tyrosine phosphatase activity by a cAMP-dependent mechanism in rat adrenal gland. *European journal of biochemistry / FEBS* 265:911-918
219. **Paz C, Cornejo Maciel F, Maloberti P, Walsh LP, Stocco DM, Podesta EJ** 2002 Protein tyrosine phosphatases are involved in LH/chorionic gonadotropin and 8Br-cAMP regulation of steroidogenesis and StAR protein levels in MA-10 Leydig cells. *The Journal of Endocrinology* 175:793-801
220. **Gorostizaga A, Cornejo Maciel F, Brion L, Maloberti P, Podesta EJ, Paz C** 2007 Tyrosine phosphatases in steroidogenic cells: regulation and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 265-266:131-137
221. **Brion L, Maloberti PM, Gomez NV, Poderoso C, Gorostizaga AB, Mori Sequeiros Garcia MM, Acquier AB, Cooke M, Mendez CF, Podesta EJ, Paz C** 2011 MAPK phosphatase-1 (MKP-1) expression is up-regulated by hCG/cAMP and modulates steroidogenesis in MA-10 Leydig cells. *Endocrinology* 152:2665-2677
222. **Sewer MB, Waterman MR** 2003 CAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278:8106-8111
223. **Casal AJ, Ryser S, Capponi AM, Wang-Buholzer CF** 2007 Angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression in bovine adrenal glomerulosa cells: implications in mineralocorticoid biosynthesis. *Endocrinology* 148:5573-5581
224. **Lorenz S, Mattson P** 1986 Cinemicrographic observations of cultured adrenocortical tumor cells. Dynamic responses to ACTH and cytochalasin B. *Virchows Archiv* 52:221-236
225. **Temple R, Wolff J** 1973 Stimulation of steroid secretion by antimicrotubular agents. *The Journal of Biological Chemistry* 248:2691-2698
226. **Saltarelli D, De la Llosa-Hermier MP, Tertrin-Clary C, Hermier C** 1984 Effects of antimicrotubular agents in cAMP production and in steroidogenic response of isolated rat Leydig cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 52:259-266
227. **Kotani S, Murofushi H, Sakai H** 1988 Dual effect of antimitotic drugs on steroid secretion in mouse adrenocortical Y-1 tumor cells. *Cell Structure and Function* 13:171-177
228. **Nagy L, Freeman DA** 1990 Effect of cholesterol transport inhibitors on steroidogenesis and plasma membrane cholesterol transport in cultured MA-10 Leydig tumor cells. *Endocrinology* 126:2267-2276

229. **Cornejo Maciel F, Poderoso C, Gorostizaga A, Paz C, Podesta EJ** 2001 LH/chorionic gonadotropin signaling pathway involves protein tyrosine phosphatase activity downstream of protein kinase A activation: evidence of an obligatory step in steroid production by Leydig cells. *The Journal of Endocrinology* 170:403-411
230. **Paz C, Dada LA, Cornejo Maciel MF, Mele PG, Cymeryng CB, Neuman I, Mendez CF, Finkielstein CV, Solano AR, Park M, et al.** 1994 Purification of a novel 43-kDa protein (p43) intermediary in the activation of steroidogenesis from rat adrenal gland. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 224:709-716
231. **Finkielstein CV, Maloberti P, Mendez CF, Podesta EJ** 1998 A novel arachidonic acid-related thioesterase involved in acute steroidogenesis. *Endocrine Research* 24:363-371
232. **Maloberti P, Mele PG, Neuman I, Cornejo Maciel F, Cano F, Bey P, Paz C, Podesta EJ** 2000 Regulation of arachidonic acid release in steroidogenesis: role of a new acyl-CoA thioesterase (ARTIS_t). *Endocrine Research* 26:653-662
233. **Cano F, Poderoso C, Cornejo Maciel F, Castilla R, Maloberti P, Castillo F, Neuman I, Paz C, Podesta EJ** 2006 Protein tyrosine phosphatases regulate arachidonic acid release, StAR induction and steroidogenesis acting on a hormone-dependent arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 99:197-202
234. **Cooke M, Orlando U, Maloberti P, Podesta EJ, Cornejo Maciel F** 2011 Tyrosine phosphatase SHP2 regulates the expression of acyl-CoA synthetase ACSL4. *Journal of Lipid Research* 52:1936-1948
235. **Kinney CM, Chandrasekharan UM, Yang L, Shen J, Kinter M, McDermott MS, DiCorleto PE** 2009 Histone H3 as a novel substrate for MAP kinase phosphatase-1. *American Journal of Physiology* 296:C242-249
236. **Boutros T, Chevet E, Metrakos P** 2008 Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological Reviews* 60:261-310
237. **Schimmer BP, Tsao J, Cordova M, Mostafavi S, Morris Q, Scheys JO** 2010 Contributions of steroidogenic factor 1 to the transcription landscape of Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 336:85-91
238. **Duan H, Jefcoate CR** 2007 The predominant cAMP-stimulated 3 x 5 kb StAR mRNA contains specific sequence elements in the extended 3'UTR that confer high basal instability. *Journal of Molecular Endocrinology* 38:159-179
239. **Chen WY, Weng JH, Huang CC, Chung BC** 2007 Histone deacetylase inhibitors reduce steroidogenesis through SCF-mediated ubiquitination and degradation of steroidogenic factor 1 (NR5A1). *Molecular and Cellular Biology* 27:7284-7290
240. **Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
241. **Pfaffl MW** 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
242. **Martinelle N, Holst M, Soder O, Svechnikov K** 2004 Extracellular signal-regulated kinases are involved in the acute activation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 145:4629-4634
243. **Dufau ML, Tsuruhara T, Horner KA, Podesta E, Catt KJ** 1977 Intermediate role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:3419-3423

244. **Mori Sequeiros García MM, Gómez NV, Gorostizaga AB, Brion L, Acquier AB, Méndez CF, C. P** 2011 Relevance of different ERK 1/2 phosphorylation consensus sites in MKP-1 stability in Leydig cells. In: *Biocell*; 127
245. **Truong K, Lee TD, Li B, Chen Y** Sumoylation of SAE2 C terminus regulates SAE nuclear localization. *The Journal of Biological Chemistry* 287:42611-42619
246. **Inuzuka H, Gao D, Finley LW, Yang W, Wan L, Fukushima H, Chin YR, Zhai B, Shaik S, Lau AW, Wang Z, Gygi SP, Nakayama K, Teruya-Feldstein J, Toker A, Haigis MC, Pandolfi PP, Wei W** 2012 Acetylation-dependent regulation of Skp2 function. *Cell* 150:179-193
247. **Chung J, Khadka P, Chung IK** Nuclear import of hTERT requires a bipartite nuclear localization signal and Akt-mediated phosphorylation. *Journal of Cell Science* 125:2684-2697
248. **Lawan A, Al-Harhi S, Cadalbert L, McCluskey AG, Shweash M, Grassia G, Grant A, Boyd M, Currie S, Plevin R** 2011 Deletion of the dual specific phosphatase-4 (DUSP-4) gene reveals an essential non-redundant role for MAP kinase phosphatase-2 (MKP-2) in proliferation and cell survival. *The Journal of Biological Chemistry* 286:12933-12943
249. **Aggarwal A, Misro MM, Maheshwari A, Sehgal N, D. N** 2010 N-acetylcysteine counteracts oxidative stress and prevents hCG-induced apoptosis in rat Leydig cells through down regulation of caspase-8 and JNK. *Mol Reprod Dev* 77
250. **Park SJ, Kim TS, Park CK, Lee SH, Kim JM, Lee KS, Lee IK, Park JW, Lawson MA, Lee DS** 2013 hCG-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in Leydig cells of the testis. *Journal of Molecular Endocrinology* 50:151-166
251. **Brion L** 2010 Regulación hormonal y papel funcional de la MAP Quinasa Fosfatasa-1 (MKP-1) en células esteroideogénicas. In: *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires*
252. **Yamashita S, Tai P, Charron J, Ko C, Ascoli M** 2011 The Leydig cell MEK/ERK pathway is critical for maintaining a functional population of adult Leydig cells and for fertility. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)* 25:1211-1222
253. **Martin LJ, Boucher N, El-Asmar B, Tremblay JJ** 2009 cAMP-induced expression of the orphan nuclear receptor Nur77 in MA-10 Leydig cells involves a CaMKI pathway. *Journal of Andrology* 30:134-145
254. **Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E** 2002 Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)* 16:1638-1651
255. **Stocco CO, Lau LF, Gibori G** 2002 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. *The Journal of Biological Chemistry* 277:3293-3302
256. **Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, Guroff G** 2000 Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nature Cell Biology* 2:435-440
257. **Hall SH, Berthelon MC, Avallet O, Saez JM** 1991 Regulation of c-fos, c-jun, jun-B, and c-myc messenger ribonucleic acids by gonadotropin and growth factors in cultured pig Leydig cell. *Endocrinology* 129:1243-1249
258. **Lan HC, Wu CF, Shih HM, Chung BC** 2012 Death-associated protein 6 (Daxx) mediates cAMP-dependent stimulation of Cyp11a1 (P450scc) transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 287:5910-5916