Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Expresión y función de las MAP quinasas fosfatasas 1 y 3 (MKP-1 y MKP-3) en células de Leydig

Mori Sequeiros Garcia, María de las Mercedes

2014

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:
Mori Sequeiros Garcia, María de las Mercedes. (2014). Expresión y función de las MAP quinasas fosfatasas 1 y 3 (MKP-1 y MKP-3) en células de Leydig. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Mori Sequeiros Garcia, María de las Mercedes. "Expresión y función de las MAP quinasas fosfatasas 1 y 3 (MKP-1 y MKP-3) en células de Leydig". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Expresión y función de las MAP quinasas fosfatasas 1 y 3 (MKP-1 y MKP-3) en células de Leydig

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. María de las Mercedes Mori Sequeiros Garcia

Directora de Tesis: Dra. Cristina Paz

Consejero de Estudios: Dr. Omar Pignataro

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

Buenos Aires, 2014

Expresión y función de las MAP quinasas fosfatasas 1 y 3 (MKP-1 y MKP-3) en células de Leydig

MKP-3 es una enzima inducible sólo por estímulos proliferativos que desfosforila específicamente a ERK1/2. En cambio MKP-1 desfosforila diferentes MAPKs y se induce por diversos tipos de estímulos. En este trabajo se analizaron aspectos regulatorios y funcionales de ambas enzimas en células de Leydig MA-10 bajo la estimulación del receptor de LH (RLH) con hCG o en presencia del derivado del segundo mensajero correspondiente, 8Br-AMPc.

Este estudio pone en evidencia, por primera vez, que la activación del RLH regula la expresión de MKP-3. hCG y 8Br-AMPc aumentan los niveles de MKP-3 activando la expresión génica por eventos dependientes e independientes de ERK1/2 y promoviendo modificaciones post-traduccionales que estabilizan la proteína. Se demostró que la activación del RLH conduce a la inducción p21, un inhibidor de la proliferación, y que este efecto es dependiente de MKP-3.

Respecto de la enzima nuclear MKP-1, se determinó que el AMPc regula su estabilidad por múltiples fosforilaciones, involucrando la fosforilación por ERK1/2 en sitios consenso relacionados con la estabilidad (S359 y S364) y con la inestabilidad (S296 y S323) de la proteína. Se demostró que la inducción del factor de transcripción NUR77 por 8Br-AMPc, factor que participa en expresión de genes cruciales para la esteroidogénesis, es dependiente de ERK1/2 y se determinó que MKP-1 y sus modificaciones post-traduccionales impactan en la inducción de NUR77 por 8Br-AMPc.

Se concluye que la inducción de MKP-1 y MKP-3 por estimulación del RLH modula las acciones de LH sobre la esteroidogénesis y la proliferación de las células de Leydig.

Palabras clave: MKP-1, MKP-3, células de Leydig, PKA, ERK1/2.

Expression and functional role of MAP kinase phosphatases 1 and 3 (MKP-1 y MKP-3) in Leydig cells

MKP-3 is an enzyme inducible only by proliferative stimuli and involved specifically in ERK1/2 dephosphorylation. In contrast, MKP-1 is an enzyme inducible by different stimuli and able to dephosphorylate different MAPKs. This work analyzes regulatory and functional aspects of both phosphatases in MA-10 Leydig cells under the stimulation of the luteinizing hormone receptor (LHR) with human chorionic gonadotropin hormone (hCG) or a permeable derivative of the corresponding second messenger (8Br-cAMP).

The present study demonstrates, for the first time, the expression of MKP-3 by the activation of LHR. hCG and cAMP increase MKP-3 levels by activating gene expression –through ERK1/2-dependent and independent events- and promoting post-translational modifications that increase protein stabilization. This work also demonstrates that the activation of LHR leads to the induction of p21, an inhibitor of cell proliferation, by a mechanism involving MKP-3 expression.

Regarding the nuclear enzyme MKP-1, this work shows that cAMP regulates MKP-1 half life by ERK1/2-mediated phosphorylation in sites involved in protein stabilization (S359 and S364) and destabilization (S259 and S263). It is also established that transcription factor NUR77, whose action is essential for the expression of crucial steroidogenic genes, is cAMP-induced by an ERK-dependent mechanism. In line with this finding, this study also demonstrates that MKP-1 and its post-translational modifications impact on MKP-3 expression.

It is concluded that the induction of MKP-1 and MKP-3 by LHR activation modulates LH actions on steroidogenesis and proliferation of Leydig cells.

Key words: MKP-1, MKP-3, Leydig cells, PKA, ERK1/2

A las instituciones que hicieron posible que este trabajo de tesis se llevara a cabo, la Universidad de Buenos Aires, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

A la Dra. Cristina Paz, por ser mi jefa y directora, por elegirme para realizar este trabajo de tesis, por alentarme a seguir adelante y ser optimista, por encontrar siempre una explicación a los resultados, por trabajar a la par mía cuando fuera necesario. Gracias Cris por tu dedicación de todos estos años!

Al Dr. Carlos Mendez, Charly, por estar siempre dispuesto a contestar mis preguntas y resolver problemas. Por tus palabras justas en los momentos necesarios. Por los viajes a Mar del Plata, las Toddys y la Cindor!

Al Dr. Ernesto Podestá, por permitirme formar parte de este grupo de trabajo.

Al Dr. Omar Pignataro, por ser mi consejero de estudios.

A la Dra. Silvia Gonzalez por su aporte invalorable en los experimentos de PCR de este trabajo.

A mis compañeras de mesada, Andre, Lau, Ale y Nati, por compartir el trabajo diario, con sus alegrías y sus pormenores. Por las risas compartidas, los llantos, las desafinaciones musicales, las tardes de café y las papas con queso cheddar. Ale, gracias por tu ayuda y por las citas de último momento. Andre, gracias por acompañarme y ayudarme siempre. Laurita, gracias por la paciencia en mis inicios, por enseñarme numerosas técnicas y por confiarme a tu querida MKP-1, espero no defraudarte!!

A las chicas del labo, Fer, Pau, Ceci, Meli, Silvana, Ale D., Isa y Fabiana, por compartir conmigo todos estos años, por ayudarme siempre, por compartir protocolos y buffers, por alentarme en los momentos difíciles. A Pau, por tu inagotable ayuda en los misterios de la biología molecular y en cada medición de luciferasa. A Fer por compartir el buen gusto por la limpieza y el orden!

A los chicos del labo, por solventar diariamente las tareas que requieren fuerza masculina, por cambiar el bidón de agua, abrir los frascos difíciles y matar las cucarachas!! A Pablo por estar siempre dispuesto a ayudarme, por corregir este texto en tiempo récord, por todos los camperos y Coca-colas compartidos. A Horacio, por compartir con nosotras todas las tardes y responder todas nuestras inquietudes médicas. A Ulises, por compartir este camino de becarios y aguantar nuestras charlas femeninas diarias.

A las chicas de "al lado", Andy, Laura, Diana, Marce, Noe, Delfi, Laura y Ana Clara, por hacerme sentir siempre como una más de su grupo, por compartir juntas el día a día.

A mi amiga Flopi, claramente no estaría acá de no ser por vos. Simplemente gracias por tu amistad, por escucharme y apoyarme en todo momento, por alentarme a seguir adelante, por sostenerme en momentos difíciles. Gracias a vos y a Germán por dejarme ser parte de su familia.

A la amiga que me dio el doctorado, Carito, por compartir el día a día conmigo, por todas las tazas de té compartidas, por escucharme siempre, por compartir conmigo las alegrías y los momentos difíciles, por dejarme, desde los inicios, ser parte de la vida de Sofía.

A mis amigas y compañeras, Eleo, Celi y Caro, con quienes inicié este camino como estudiante, por todas las tardes y noches que hemos compartido estudiando, por las miles de vivencias que pasamos juntas y la gran amistad que hemos logrado a lo largo de todos estos años.

A mis amigos de mi otra profesión, Julio y Lore, por alentarme a estudiar y seguir adelante a pesar de estar cansada, por las tardes de fotos y las horas de revelado, por todas las charlas y las cenas compartidas, por apoyarme incondicionalmente. A Judith, porque no es tarea fácil tener una inquilina becaria. Gracias!

A mis amigas Ceci, Ana, Jor, Dali, Fer, Lau, Mari, Vir y Vane, por apoyarme siempre a pesar de no entender muy bien lo que estoy haciendo, por compartir la vida misma, por no dejar que me sienta sola, por confiarme sus dudas biológicas. Espero siempre poder darles respuestas acertadas!

A mi tía Riri y mi prima Ingrid y su familia por acompañarme siempre.

A mis hermanas de la vida, Sole, Ceci y Vicky, por estar ahí siempre, caminando al lado mío.

A Virna y Beni porque simplemente... somos familia!!!

A mi tía María Celia, la tía, por estar siempre al lado mío, por quererme tanto, por haberme regalado mi primer microscopio y pasar tardes mirando nervaduras y haciendo experimentos de química conmigo, por preocuparse por mi trabajo y tratar de entenderlo.

A mi mamá y a mi papá, Susana y Jorge, por inculcarme siempre la importancia del estudio y del trabajo, por apoyarme en mis decisiones y acompañarme en este camino.

A mis hermanas, Marisu, Marife y Luján, por caminar junto a mí, por acompañarme en las buenas y en las malas, porque nada puede destruir este bloque. A mis cuñados, Mariano, Guille y Javi porque la vida quiso que fueramos familia.

A mis sobrinos, Agus, Feli, Cande y France, por alegrarnos los días con sus sonrisas y simplemente darle sentido a la vida.

17β-HSD: 17β-hidroxi-esteroide deshidrogenada

3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

7TMS: 7 regiones transmembrana,

8Br-AMPc: 8-Br-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

Act D: actinomicina D

ACTH: Adrenocorticotrofina

AKAPs: proteínas de anclaje a PKA

AKT: proteína quinasa B (también llamada PKB)

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BSA: seroalbúmina bovina (BSA),

CaMK proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina

Cdc: fosfatasas del ciclo celular (*Cell Division Cycle)*

CDK: quinasas dependientes de ciclinas

CKIs: inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas

CRE: elementos respondedores a AMPc

DSP: dominio catalítico con actividad de fosfatasa dual

DSP: proteínas fosfatasas de actividad dual

DUSP: *Dual specificity protein phosphatase* (también llamadas MKPs)

EDTA: ácido etilén diamino tetra-acético

EGF: factor de crecimiento epidermal

EGFP: proteína fluorescente verde

EGTA: ácido etilén glicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetraacético

ERKs: quinasas reguladas por señales extracelulares

EROS: especies reactivas del oxígeno

ES: error estándar de la media

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FGF: factor de crecimiento nervioso

FOXO: factores de transcripción *Forkhead*

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

GTP: Guanosina trifosfato

hCG: gonadotrofina coriónica humana

HDL: lipoproteínas de alta densidad

JAKs: Janus tirosina quinasas

JNKs: quinasas del extremo N-terminal del factor de transcripción

LDL: lipoproteínas baja densidad

LH: hormonas luteinizante

LPS: lipopolisacáridos

MAPKAPK: proteína quinasa activada por MAPK

MAPKKKs/MKKKs: MAP quinasa quinasa quinasas

MAPKKs/MKKs: MAP quinasa quinasas

MAPKs: quinasas activadas por mitógenos

MKB: dominio de unión a las MAPKs

MKPs: MAP quinasas fosfatasas (también llamadas DUSP)

MSK: quinasa activada por mitógenos y estrés

NES: secuencias de exportación nuclear

NLS: secuencias de localización nuclear

P4: progesterona

P450c17: 17α-hidroxilasa/17,20-liasa

P450scc: complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol;

P5: pregnenolona

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDK-1: quinasa dependiente de fosfoinosítidos

PIP2: fosfatidilinositol 3,4-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc

PKB: proteína quinasa B (también llamada AKT)

PKC: proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos

PLC: fosfolipasa C

PMA: forbol 12-miristato-13 acetato (activador de PKC)

proteínas fosfatasas de actividad dual (DSPs

PTPs: proteínas tirosinas fosfatasas

PTP-SL: porteína tirosina fosfatasa de tipo STEP

PVDF: membrana de polifluoruro de vinilideno

RLH: receptor de LH

RSK: quinasa ribosomal S

RTK: receptores tyrosine quinasas

RTKs: receptores tirosina quinasa

SAPKs: quinasas activadas por estrés

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS

SH2: dominio de homología con la region Scr

*sh*ARN: *short hairpin* ARN

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein

STATs: S*ignal Transducers and Activators of Transcription*

STEP: *Striatal Enriched Phosphatase*

TGF-α: factor de crecimiento tumoral α

TGF-β: factor de crecimiento tumoral beta

TSH: hormonas tirotrofina hipofisaria

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

Índice

INTRODUCCIÓN 1

I. LA FOSFORILACIÓN Y DESFOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD CELULAR 1

I.1. Transducción de señales hormonales 1

I.2. Receptores, proteínas G y segundos mensajeros 2

I.3. Proteínas quinasas y mecanismos de activación 4

I.3.1. Proteínas Tirosina Quinasas 5

I.3.2. Proteínas serina/ treonina Quinasas 6

I.3.2.a. Proteína quinasa dependiente de AMPc 6

I.3.2.b. Proteínas quinasas dependiente de ciclinas 7

I.3.2.c. Proteína quinasa B (PKB/ AKT) 8

I.3.2.d. Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos 9

- Clasificación 9

- Mecanismo de activación y regulación de la actividad de las MAPKs 10

- Sustratos de las MAPKs 12

I.4. Proteínas fosfatasas 12

I.4.1. Proteínas serina/ treonina Fosfatasas 13

I.4.2. Proteínas Tirosina Fosfatasas 13

I.4.2.a. Proteínas PTPs "clásicas" o PTPs 13

I.4.2.b. Proteínas Fosfatasas de Actividad Dual 14

I.4.3. MAP quinasa fosfatasas (MKPs) 14

I.4.3.a. Estructura de las MKPs 16

I.4.3.b. Regulación transcripcional y post-traduccional de las MKPs 18

I.4.3.c. Mecanismo de acción 21

I.4.3.d. La participación de MKPs en el control de la actividad celular 22

II. LA CÉLULA DE LEYDIG BAJO EL CONTROL DE LA HORMONA TRÓFICA COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE MKPs 24

II.1. Síntesis de esteroides y tejidos esteroidogénicos 24

II.1.1. Biosíntesis de hormonas esteroideas 24

II.1.2. La célula de Leydig y síntesis de andrógenos 26

II.2. Hormonas esteroidogénicas y su mecanismo de acción 27

II.2.1. Hormonas esteroidogénicas 27

II.2.2. La activación del receptor del LH y las quinasas involucradas 28

II.3. Acción biológica de LH en células de Leydig 30

II.3.1. Acción de LH sobre la proliferación celular y apoptosis 30

II.3.2. Acción de LH sobre la esteroidogénesis 31

- Función de la proteína StAR en la estimulación de la esteroidogénesis 32

- Regulación de la expresión de StAR 32

II.3.2.a. Participación de proteína fosfatasas en la acción de LH sobre la esteroidogénesis 35

- La activación de PTPs en la inducción de StAR 35

- La inducción de MKPs por estimulación del RLH 36

- El papel funcional de la inducción de MKP-1 y 2 en la acción de LH 37

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 39

MATERIALES Y MÉTODOS 42

I. REACTIVOS UTILIZADOS 42

II. LÍNEA CELULAR 43

III. TRATAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS 43

III. 1. Estimulación de las células 43

III. 2. Obtención de los lisados celulares 43

IV. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS 44

IV.1. Determinación de proteínas por el método de Bradford 44

IV.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) 44

IV.3. Western blot 44

IV.4. Inmunocitoquímica 45

V. ANÁLISIS DE ARN Y ADN 46

V.1. Extracción de ARN total 46

V.2. Reacción de transcripción reversa 46

V.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real 47

VI. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN 48

VI.1. Electroforesis en geles de agarosa 49

VII. MÉTODOS GENERALES DE OBTENCIÓN DE VECTORES 49

VII.1. Plásmidos utilizados 49

VII.2. Ligación en el plásmido pGEM®-T Easy 51

VII.3. Obtención del plásmido de expresión pFLAG-MKP-3 51

VII.4. Obtención de un vector de expresión de un ARN de interferencia específico para MKP-3 52

VII.5. Mutación sitio-dirigida 53

VIII. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO DE BACTERIAS 54

VIII.1. Preparación de bacterias competentes 54

VIII.2. Transformación de *Escherichia coli* competentes 55

IX. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO 55

IX.1. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico a pequeña escala 55

IX.2. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico a mediana

escala 56

X. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LAS LÍNEAS CELULARES 56

XI. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA 57

XII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 57

RESULTADOS 58

I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MKP-3 POR hCG EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10. 58

I.1. Regulación de los niveles del ARNm de MKP-3 58

I.1.1. Efecto de hCG y AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-3 58

I.1.2. Efecto del bloqueo de la transcripción sobre el aumento del ARNm de MKP-3 promovido por AMPc 60

I.1.3. Determinación de la estabilidad del ARNm de MKP-3 61

I.1.4. Análisis de la participación de ERK1/2 en la acción del AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-3 63

I.2. Efecto de la estimulación sobre los niveles y localización subcelular de la proteína MKP-3 64

I.2.1. Efecto del AMPc sobre los niveles de la proteína MKP-3 64

I.2.2. Localización subcelular de MKP-3 en células de Leydig MA-10 65

I.3. Regulación post-traduccional de MKP-3 67

I.3.1. Estrategia para la sobreexpresión transitoria de MKP-3 67

I.3.2. Efecto de hCG/AMPc sobre los niveles de la proteína flag-MKP-3 69

II. ANÁLISIS DEL PAPEL FUNCIONAL DE MKP-3 EN LA ACCIÓN DE LH/hCG SOBRE LAS CÉLULAS DE LEYDIG MA-10 72

II.1. Diseño y validación de la construcción utilizada para disminuir el grado de expresión de la proteína MKP-3 72

II.2. Efecto del nivel de expresión de MKP-3 sobre el grado de fosforilación de ERK1/2 **74**

II.3. Efecto de MKP-3 sobre la expresión de p21 en células de Leydig MA-10 **75**

II.3.1. Análisis del efecto de hCG y AMPc sobre la expresión de p21 **76**

II.3.2. Análisis del efecto de MKP-3 sobre la expresión de p21 **78**

III. REGULACIÓN DE MKP-1 EN CÉLULAS de LEYDIG MA-10: IMPLICANCIA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA **80**

III.1. Determinación de la estabilidad de la proteína MKP-1 **80**

III.2. Efecto de la estimulación con 8Br-AMPc sobre la expresión de NUR77 **83**

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES **88**

I. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE MKP-3 EN CÉLULAS DE LEYDIG **88**

II. CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE MKP-1 POR MÚLTIPLES FOSFORILACIONES: IMPACTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE NUR77 **95**

BIBLIOGRAFÍA **100**

Introducción

I. LA FOSFORILACIÓN Y DESFOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD CELULAR

I.1. Transducción de señales hormonales

La capacidad de los organismos vivos para adaptarse a los continuos cambios del entorno es esencial para garantizar su supervivencia. Por tal motivo, todos los organismos, desde los unicelulares hasta los organismos pluricelulares más complejos, han desarrollado mecanismos apropiados para captar la información del medio que los rodea y responder apropiadamente. Estos mecanismos, y la capacidad de los organismos de elaborar respuestas altamente específicas en el marco temporal apropiado, aseguran la homeostasis.

Los cambios que continuamente se producen en el entorno impactan en las células como "señales". Algunas de las señales pueden ser de naturaleza física, como cambios en la temperatura, en la osmolaridad y luminosidad del medio extracelular. La presencia de moléculas de naturaleza diversa tales como proteínas, péptidos, aminoácidos, esteroides, derivados de ácidos grasos y hasta gases disueltos, como el óxido nítrico y el monóxido de carbono en el medio extracelular son algunas de las señales químicas que impactan en las células. Un ejemplo de este tipo de señales es el constituido por las hormonas proteicas como las hormonas luteinizante (LH) y adrenocorticotrofina (ACTH), las cuales promueven, a través de la regulación de la expresión de diferentes genes, la síntesis de esteroides en sus respectivos tejidos blanco.

Generalmente las moléculas pequeñas difunden fácilmente a través de las membranas y actúan directamente sobre un componente celular produciendo un determinado efecto. En otros casos la molécula que difunde al interior celular, llamada ligando, se une a una molécula denominada receptor y el complejo ligando-receptor actúa generalmente sobre el material genético modificando la expresión de genes como mecanismo para transmitir el mensaje. En cambio, las macromoléculas (como por ejemplo las hormonas proteicas) requieren un mecanismo altamente especializado que incluye varios pasos y moléculas. La activación de un receptor de superficie celular por una molécula extracelular se conoce como transducción de señal. La activación de este receptor genera y transmite intracelularmente señales por medio de interacciones proteína-proteína. Por último, se ejecuta la respuesta. Los receptores, tanto de membrana como los intracelulares, se caracterizan por reconocer de manera específica al ligando, lo cual determina que la respuesta que se genera como activación del sistema sea altamente específica.

La variedad de señales a las cuales las células pueden responder es extremadamente amplia. Sin embargo, la evolución ha seleccionado y perfeccionado sólo una serie acotada de sistemas de transducción de señales capaces de generar una respuesta determinada para cada estímulo en diferentes tipos celulares. Además de la especificidad de los receptores, cada tipo celular presenta maquinarias efectoras específicas, de forma tal que las señales generadas en la cascada de transducción de dos o más estímulos, aún siendo idénticos, pueden activar una respuesta distinta en cada tipo celular. Esta maquinaria de señalización está conformada por diversas moléculas, generalmente enzimas. Un grupo importante de estas enzimas son proteínas capaces de catalizar la fosforilación de proteínas. Estas enzimas, denominadas proteínas quinasas, promueven cambios en el grado de fosforilación de las proteínas blanco y como consecuencia, la actividad biológica de la proteína fosforilada se modifica. Este cambio en la actividad biológica constituye el mecanismo que la célula implementa para adaptarse al cambio en el medio externo.

Las fosfatasas de proteínas son un grupo de enzimas que modifican el grado de fosforilación de las proteínas, removiendo grupos fosfato, por lo que estas enzimas son también componentes esenciales de los mecanismos de transducción de señales. En diferentes sistemas hay innumerables ejemplos de la modificación de una actividad enzimática como consecuencia de la fosforilación o desfosforilación. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que existen otras modificaciones que llevan a cambios en la actividad biológica de las proteínas. Por ejemplo, la acetilación y la metilación, entre otras. Por otro lado, la fosforilación puede impactar sobre factores de transcripción y, en consecuencia, sobre la expresión génica.

Previamente mencionamos que las hormonas LH y ACTH, las cuales controlan la producción de esteroides en gónadas y adrenales respectivamente, son hormonas que desencadenan la activación de receptores hormonales. En el marco de esta tesis discutiremos aspectos relacionados con la activación de los receptores de estas hormonas. Más específicamente, analizaremos la cascada de transducción de señales que dispara la activación del receptor de LH (RLH), en células de Leydig. En las secciones siguientes describiremos los componentes de la cascada de señalización hormonal que están implicados en la activación del RLH.

I.2. Receptores, proteínas G y segundos mensajeros

Los receptores hormonales son moléculas capaces de reconocer y unir un ligando (como hormonas, neurotrasmisores, vitaminas u otro tipo de moléculas) con

alta afinidad y especificidad. Un grupo importante de hormonas son de naturaleza liposolubles y esto les confiere la capacidad de difundir a través de las membranas e interactuar con receptores intracelulares, como es el caso de las hormonas tiroideas. Las hormonas de naturaleza proteica, por su hidrofilicidad y tamaño no pueden atravesar libremente las membranas celulares, por lo tanto se unen a receptores ubicados en la superficie de las células. Actualmente se conoce que algunas hormonas liposolubles pueden activar tanto receptores intra como extracelulares. Ejemplos de estas hormonas son las hormonas tiroides, esteroides (*Kelly y Ronnekleiv, 2008*) y la vitamina D (*Carlberg y Campbell, 2013*).

Todos los receptores de membrana tienen al menos un dominio extracelular, donde se localiza el sitio de unión al ligando, y un dominio citoplasmático. La transducción de señales a través de la membrana plasmática es posible por la cooperación de diferentes componentes. En primer lugar, el receptor reconoce a la hormona mediante su dominio extracelular. Luego el receptor activa, por su dominio intracelular, a otras proteínas situadas en el citoplasma mediante cambios conformacionales que afectan las actividades de las mismas. Las proteínas efectoras activadas están situadas normalmente en contacto con la membrana plasmática, o están ancladas a la membrana por medio de lípidos de membrana. A través de una modificación postraduccional como miristilación, palmitoilación, farnesilación, geranilación y unión a glucosil-fosfatidilinositol, muchas proteínas asociadas a membrana pueden ser activadas secuencialmente y finalmente enviar la señal por medio de la generación moléculas solubles al interior de la célula. Estas moléculas solubles se denominan segundos mensajeros, en tanto que la señal extracelular que activó el sistema se denomina primer mensajero.

Ciertas hormonas se unen a receptores que tienen actividad catalítica, en particular estos receptores tienen la capacidad de fosforilar proteínas en residuos de tirosina, razón por la cual se los denomina receptores tirosina quinasa (*Receptor Tyorsine Kinases*, RTKs) (*Carraway y col., 1994; P. Blume-Jensen y Hunter, 2001, Schlessinger y Lemmon, 2006*). Dentro de este grupo están los receptores de la mayor parte de los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (*Epidermal Growth Factor,* EGF), el factor de crecimiento tumoral α (*Tumor Growth Factor* α*,* TGF-α), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor,* PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endotelial Growth Factor,* VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor;* FGF*)*, y el receptor de la insulina. Los receptores de esta familia tienen un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa intrínseca. Cuando se une el ligando, el

receptor se dimeriza, lo que induce la autofosforilación de las tirosinas del dominio intracelular y activa la tirosina quinasa, que fosforila (y por tanto activa) muchas moléculas efectoras en cascada, de forma directa o mediante proteínas adaptadoras. Este mecanismo puede, en última instancia, fosforilar y activar factores de transcripción y llevar la información al núcleo. Por ejemplo el EGF y el PDGF promueven la fosforilación de los factores de transcripción de la familia STAT a través de la activación de sus receptores RTK (*Receptor Tyrosine Kinases*) (*Ruff-Jamison y col, 1995; Vignais y col., 1995*).

Otra familia muy amplia de receptores incluye miembros que exhiben una característica estructural común: presentan 7 regiones transmembrana, motivo por el cual se los denomina 7TMS (7 *Trans-Membrane Segments*). Estos receptores presentan el extremo amino en el espacio extracelular y el extremo carboxilo en el espacio citoplasmático (*Lefkowitz RJ., 2007*)

Los receptores tipo 7TMS interaccionan con un tipo particular de proteínas denominadas proteínas G. La denominación se debe al hecho que unen nucleótidos de guanina. Estas proteínas están constituidas por 3 subunidades: α, β y γ. La caracterización de estas subunidades muestra la existencia de un amplio número de isoformas de la subunidad α que han sido agrupadas en cuatro familias: α_s, α_i, α_q, α_{12} (*Milligan y Kostenis, 2006*). 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.

I.3. Proteínas quinasas y mecanismos de activación

La activación de los receptores 7TMS promueve la liberación de la subunidad α unida a GTP y el dímero $\beta\gamma$. La función de la subunidad α en la transducción de señales está ampliamente caracterizada y consiste en activar diferentes moléculas efectoras tales como enzimas, canales iónicos, transportadores de iones, etc (*Lambright y col., 1994*). En contraste, la función de los dímeros $\beta\gamma$ es menos conocida, aunque actualmente se sabe que estas subunidades también tienen un rol en la señalización intracelular (*Khan y col., 2013*). A modo de ejemplo, puede mencionarse que estos dímeros son capaces de activar rutas bioquímicas que conducen a la activación de una familia de proteínas quinasas que se conoce con el nombre de quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases,* MAPKs) (*Sugden y Clerk, 1997*).

Como resultado del acople entre el receptor y la correspondiente subunidad α-GTP se activan, entre otro tipo de moléculas, diferentes enzimas como fosfolipasas, fosfodiesterasas, ciclasas de nucleótidos, entre otras. La activación de estas enzimas promueve un aumento en la concentración intracelular de los productos correspondientes. Estos son pequeñas moléculas que amplifican la señal disparada por la hormona. Un ejemplo de este tipo de enzimas es la adenilil ciclasa que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP. El AMPc (segundo mensajero) actúa activando a la proteína quinasa dependiente de AMPc (*Protein Kinase cAMP-dependent,* PKA). Por otro lado, la fosfolipasa C cataliza la formación de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) por hidrólisis del fosfolípido 4,5 bifosfato-fosfatidil inositol. El DAG es un mensajero que permanece anclado a la membrana plasmática, en donde activa a la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos (*Protein Kinase Calcium-dependent*, PKC), proteína que posteriormente participará en el proceso de señalización hacia el interior de la célula. 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 esta organela. El Ca^{2+}, el GMP cíclico (GMPc) son otros ejemplos de segundos mensajeros.

La generación de segundos mensajeros conduce a la activación de quinasas y la consecuente fosforilación de proteínas. Esta modificación covalente cambia las propiedades estructurales de las proteínas y en la mayoría de los casos, este cambio estructural se asocia con un cambio en la actividad biológica de las mismas, dando como resultado final un cambio en la actividad celular. Sin embargo debe tenerse en cuenta que el grado de fosforilación de las proteínas depende del balance neto de las actividades de proteínas quinasas y proteínas fosfatasas. Por lo tanto, ambos tipos de enzimas son igualmente importantes para la señalización intracelular y a ellas nos referiremos con más detalle en las secciones siguientes.

I.3.1. Proteínas Tirosina Quinasas

Las proteínas quinasas catalizan la transferencia del grupo fosfato en posición γ del ATP a los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina, treonina o tirosina de diversas proteínas. Según el aminoácido al cual transfieren el grupo fosfato, estas enzimas se clasifican en: proteínas tirosina quinasas o proteínas serina/treonina quinasas.

Un grupo de proteína tirosina quinasas es de localización intracelular. A este grupo pertenecen las quinasas JAKs (*Janus Tyrosine Kinase*) y las quinasas de la

familia Src. Las JAKs se asocian a receptores de tipo tirosina quinasa y fosforilan a las proteínas STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (*Ihle JN., 1994*). Las quinasas Src fosforilan fundamentalmente proteínas del citoesqueleto o moléculas de adhesión (*Shchemelinin, 2006*).

El grupo más ampliamente caracterizado de proteínas tirosina quinasas es el conformado por los RTKs. Como ya mencionamos, estos receptores son los mediadores de la acción de diversos factores de crecimiento (*Aaronson y col., 1990*). La autofosforilación del receptor en sitios específicos es importante porque se generan sitios de anclaje para las moléculas blanco (*Pawson y Gish, 1992; Bork y Margolis, 1995*). Dichas moléculas son capaces de unirse a los residuos fosforilados en tirosina a través de sus dominios SH2 (*Scr Homology region*). Este reclutamiento de diferentes moléculas facilita la interacción entre las mismas.

I.3.2. Proteínas serina/ treonina Quinasas

A este grupo pertenecen, entre otros, el receptor del factor de crecimiento tumoral beta (*Tumoral Growth Factor Beta*, TGF-β), la PKC, la PKA, las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDK), la proteina quinasa B (PKB o AKT) y las MAPKs.

La actividad de estas quinasas puede ser regulada por eventos específicos (daño al ADN, estrés oxidativo, radiación UV) o por numerosas señales químicas que incluyen AMPc, GMPc, DAG, y Ca^{2+}/calmodulina, entre otros.

I.3.2.a. Proteína quinasa dependiente de AMPc

La PKA tiene un papel relevante en el control de la actividad celular por su capacidad de regular procesos celulares tales como la proliferación y la diferenciación (*Vermeulen y col., 2003*), la organización de la red de microtúbulos (*Langevin y col., 2005*), la condensación y descondensación de la cromatina y la exocitosis en diversos tipos celulares (*Sedej y col., 2005*). En el contexto de este trabajo, cabe destacar que la PKA tiene un rol relevante en el control de la producción de esteroides, ya que el mecanismo de transducción de señales de la hormona LH incluye la acción de esta quinasa.

La 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 (RIα, RIβ, RIIα, RIIβ) y de las subunidades C (Cα, Cβ, Cγ) (*Skalhegg y Tasken, 2000*). Estas subunidades se expresan diferencialmente en los distintos tejidos, y son capaces de integrar distintas isoformas de PKA. El mecanismo de activación de PKA involucra la unión del AMPc a los sitios denominados A y B en cada subunidad R. En el estado inactivo de la holoenzima, solamente el sitio B está expuesto y disponible para la unión al AMPc. Cuando se ocupa este sitio se incrementa la unión del AMPc al sitio A por un cambio estérico intramolecular. La unión de cuatro moléculas de AMPc, dos a cada subunidad R, lleva a un cambio conformacional y a la disociación de un dímero de R unido a cuatro moléculas de AMPc y de dos monómeros de C. Las subunidades C, que en este estado son catalíticamente activas, fosforilan a sus sustratos específicos en residuos de serina y treonina. Las subunidades R, particularmente las isoformas RII, pueden asociarse con proteínas de anclaje llamadas AKAPs (*A-Kinase Anchoring Proteins*) que permiten localizar a la holoenzima PKA en diferentes compartimentos subcelulares para fosforilar diferentes sustratos según el estímulo (*Smith y Scott , 2006*). 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 (*Jarnaess y Tasken, 2007*).

I.3.2.b. Proteínas quinasas dependiente de ciclinas

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. Las CDKs son proteínas pequeñas que se unen a proteínas reguladoras, llamadas ciclinas, y de esta forma poseen actividad quinasa. Por ejemplo, cuando una célula quiescente recibe un estímulo mitogénico, se expresan miembros de la familia de ciclina D, las cuales activan a CDK4 y CDK6. El complejo ciclina D-CDK4/6 inicia la fosforilación de miembros de la familia de proteínas del retinoblastoma (RB), lo cual produce la liberación de factores de transcripción, permitiendo la expresión de genes requeridos para continuar el ciclo celular (*Miller y Flaherty, 2014*).

A su vez, los complejos ciclinas-CDKs son regulados por los inhibidores de CDKs, los CKIs (*Cyclin-dependet kinase Inhibitors*), los cuales están implicados en la supresión de la proliferación celular en condiciones de estrés causado por deficiencia en factores de crecimiento, daño al ADN, citoquinas antiproliferativas, entre otros

(*Romanov y col., 2012*). La proteína p21 es un CKI que pertenece al grupo Cip/Kip y es capaz de inactivar la CDK2. Los miembros de la familia Cip/Kip, son responsables del control del ciclo celular, bloqueando la transición de la fase G1 a fase S.

I.3.2.c. Proteína quinasa B (PKB/ AKT)

La proteína quinasa B (PKB), también conocida como AKT, tiene un importante rol en la vías de transducción de señales activadas por factores de crecimiento o por insulina y está involucrada en diversas funciones celulares como crecimiento, sobrevida, metabolismo de nutrientes, entre otros (*Song y col., 2005; Meroni y col., 2002; Martelli y col., 2012).* Todas las isoformas de PKB/AKT poseen una estructura conservada: un dominio amino terminal homólogo a Pleckstrina (PH), un dominio central quinasa y un dominio hidrofóbico regulador en el extremo carboxilo. La actividad de AKT es modulada por la activación de una quinasa de fosfolípidos, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Muchos factores de crecimiento y citoquinas incrementan la actividad de la PI3K, lo cual resulta en un aumento de fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP2) y de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) en la membrana plasmática. AKT es reclutada a la membrana plasmática por su interacción con estos fosfoinosítidos y es fosforilada por una proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1), lo cual produce su activación (*Manning y Cantley, 2007*). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la activación de AKT puede producirse por una vía independiente de PI3K, por ejemplo el aumento de AMPc lleva a la activación de AKT a través de PKA y, por otro lado, la activación de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina (CaMK) también puede fosforilar y activar a AKT. Dos sitios críticos para la fosforilación y activación de AKT son la serina 473 y la treonina 308.

La vía de AKT es reconocida como una de las vías más importantes en la regulación de la sobrevida celular. Por este motivo, actualmente es estudiada en distintos tipos de cánceres. AKT tiene un efecto directo sobre la apoptosis ya que, por ejemplo, inhibe la actividad proapoptótica de proteínas como BAD, promoviendo la sobrevida celular (*Song y col., 2005*). Por otro lado, afecta la expresión de ciertos factores de transcripción como los factores *Forkhead* (FOXO) y la actividad de la familia p53. La activación de PI3K/AKT lleva a la inhibición de los factores FOXO mediante una fosforilación inhibitoria (*Hay N., 2011*).

I.3.2.d. Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son una familia de serina/treonina quinasas que desempeñan un papel fundamental en la regulación de una amplia variedad de funciones celulares, que incluyen la proliferación y diferenciación celular, la migración, la apoptosis, entre otras. En los seres humanos, la superfamilia de MAPK incluye una decena de miembros, entre ellos ERK1, ERK2, ERK3, ERK5 y ERK7; JNK1, JNK2, JNK3 y las proteínas p38 (*Roux y Blenis, 2004; Raman y col., 2007*).

- Clasificación

Estas quinasas se clasifican en tres grandes grupos, según el tipo de estímulo que provoca su activación, entre otras características. Estos grupos están constituidos por: (a) las quinasas reguladas por señales extracelulares (*Extracellular Regulated Kinases*, ERKs), (b) las quinasas del extremo N-terminal del factor de transcripción c-Jun (*Jun N-terminal Kinase*, JNKs), también conocidas como quinasas activadas por estrés (*Stress Activated Protein Kinases*, SAPKs), y (c) el grupo de p38 (*Roux y Blenis, 2004*).

La familia de las ERKs incluye dos enzimas denominadas ERK1 y ERK2 que exhiben una alta homología de secuencia, especialmente en el dominio de unión al sustrato (*Boulton y col., 1991*). Estas proteínas, de 44 y 42 kDa de peso molecular respectivamente, se expresan de manera ubicua y se activan principalmente en respuesta a factores de crecimiento y estímulos proliferativos en general (*Raman y col., 2007; Meloche y Pouyssegur, 2007*).

El grupo de las JNKs se activa en respuesta a múltiples formas de estrés ambiental y a citoquinas (*Ip y Davis, 1998*). Se conocen tres genes que codifican para las JNKs en mamíferos. Los genes que codifican para JNK1 y JNK2 se expresan en forma ubicua y generan 8 isoformas por maduración alternativa del ARN mensajero (*Gupta y col., 1996*).

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 (*Ashwell JD., 2006*), a distintos tipos de estrés ambiental (*Obata y col., 2000*), endotoxinas (*Abraham E., 2005*), y radiación (*Munshi y Ramesh, 2013*), 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 deben ser fosforiladas en dos residuos, treonina y tirosina, para exhibir máxima actividad (*Raman y col., 2007*). El sitio de fosforilación, ubicado en el dominio quinasa, consiste en un tripéptido con una secuencia general treonina-x-tirosina (thr-x-tyr). Los diferentes grupos de MAPKs están definidos por la identidad del aminoácido x que separa a los residuos de treonina y tirosina fosforilados, siendo el motivo de fosforilación dual thr-**glu**-tyr, thr-**gly**-tyr y thr-**pro-**tyr para los grupos de MAPKs: ERKs, p38 y JNKs respectivamente (*Schaeffer y Weber, 1999; Roux y Blenis, 2004; Tanoue y Nishida, 2002*).

La activación de las MAPKs está vinculada con la activación tanto de los RTKs como de los receptores 7TMS. Los diversos estímulos que promueven la activación de estos receptores desencadenan una cascada de eventos de fosforilación que conduce a la activación de las MAPKs. En esta cascada de fosforilaciones interviene un grupo de quinasas de actividad dual: las MAP quinasa quinasas (MAPKKs o MKKs). Las MAPKKs son altamente específicas e incluyen a MEK1 y MEK2, que activan a las ERKs; MKK3, MKK4 y MKK6 que activan al grupo de p38 y las isoformas MKK4 y MKK7 que activan al grupo de JNKs (*Roux y Blenis, 2004; Tanoue y Nishida, 2002*) (Figura 1). 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 proteínas Raf son serina/treonina quinasas que promueven la activación de MEK1 y MEK2, lo que lleva a la activación de las ERKs. La activación de Raf se produce por acción de un grupo de proteínas denominadas Ras. La activación de Ras ocurre vía RTKs y receptores 7TMS (*Sugden y Clerk, 1997*)

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

El control de la magnitud y duración de la actividad de las MAPKs y, por lo tanto, el resultado de la señalización depende también de la regulación de su estado de fosforilación por proteínas fosfatasas. La desfosforilación tanto del residuo treonina como del residuo tirosina del dominio catalítico de las MAPKs (motivo thr-x-tyr) resulta en la inhibición de su actividad enzimática. Las proteínas fosfatasas involucradas en

este proceso pueden ser proteínas tirosina fosfatasas, serina/treonina fosfatasas y fosfatasas de especificidad dual (treonina y tirosina).

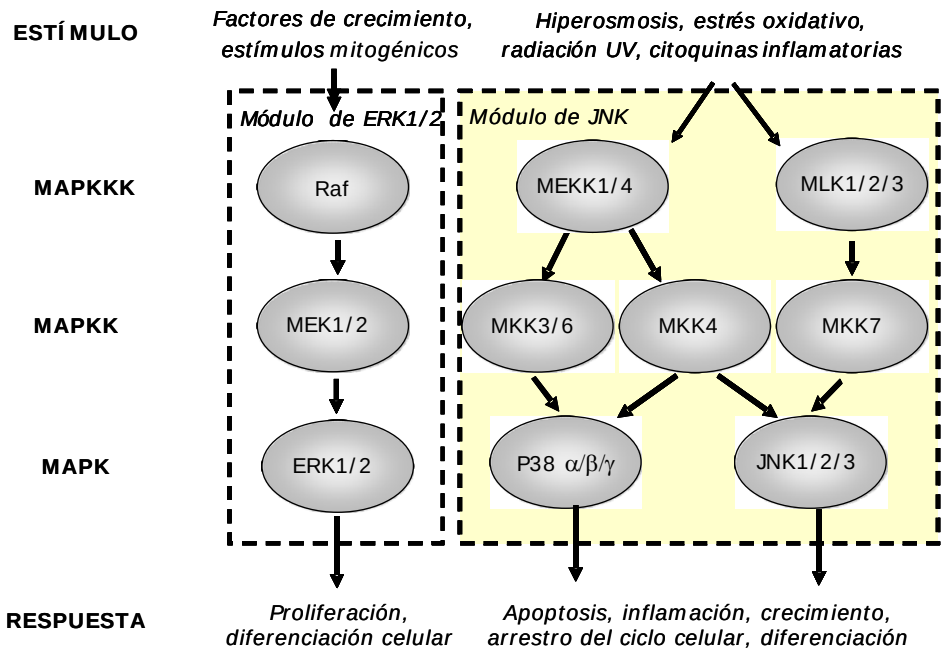


Figura1. Esquema de las cascadas de activación de los tres principales grupos de MAP quinasas: ERKs, JNKs y p38. La activación de las MAPKs incluye la fosforilación y activación secuencial de distintas proteínas por acción de diferentes quinasas especificas: las MAP quinasa quinasa quinasas (MAPKKKs o MAP3K) y las MAP quinasa quinasas (MAPKKs o MAP2K). Los estímulos desencadenan la activación del primer miembro de la cascada: MAP3K.

Entre las fosfatasas de serina/treonina que son capaces de desfosforilar a las MAPKs se ha descripto a las proteínas 2A y 2C (PP2A y PP2C) (*Saxena y Mustelin, 2000*). Entre las fosfatasas de tirosina que desfosforilan a las MAPKs se encuentran las enzimas STEP (*Striatal Enriched Phosphatase*) y PTP-SL (*Protein Tyrosine Phosphatase-STEP Like*), que desfosforilan particularmente a ERK1/2 (*Zuniga y col., 1999*). Sin embargo, existe un grupo particular de proteínas fosfatasas que tiene como función específica desfosforilar a los miembros de la familia de las MAPKs. Estas fosfatasas, denominadas MAP quinasa fosfatasas (*MAP Kinase Phosphatases*, MKPs), exhiben actividad dual (treonina y tirosina).

- Sustratos de las MAPKs

Las MAPKs se unen a sus proteínas regulatorias y a sus sustratos a través de interacciones específicas proteína-proteína en sitios determinados denominados sitios de anclaje. Estos sitios están ubicados fuera del dominio catalítico de la enzima y son fundamentales en la determinación de la especificidad de sustrato, localización subcelular y eficiencia de la actividad enzimática (*Tanoue y Nishida, 2002*). Los sustratos más ampliamente caracterizados de las MAPKs son factores de transcripción como Elk-1, c-Fos, c-Jun, STAT3. En muchos tipos celulares, el factor de transcripción NUR77, el cual tiene relevancia en el contexto de este trabajo, se activa por fosforilación mediada por ERK1/2 (*Bourhis y col., 2008*).

Sin embargo, los factores de transcripción no son los únicos sustratos de las MAPK. Estas quinasas también fosforilan enzimas citoplasmáticas, como ciertas fosfolipasas y proteínas del citoesqueleto, y proteínas de membrana como calnexina (*Roux y Blenis, 2004*). 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 (*Roux y Blenis, 2004*).

I.4. 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 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. Por lo tanto, una modificación de cualquiera de estos componentes puede tener un impacto importante en la transducción de señales. Actualmente se acepta que, en la regulación de la actividad celular, las proteínas fosfatasas cumplen funciones de similar relevancia que las proteínas quinasas.

I.4.1. Proteínas serina/ treonina Fosfatasas

Las serina/treonina fosfatasas son un grupo de enzimas que remueven grupos fosfato de residuos de serina y treonina de sus proteínas blanco. Estas 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 (*Cohen PT., 2002; Barford D., 1996*). Las isoformas PP1, PP2A, PP2B y PP2C son las responsables de casi toda la actividad de serina/treonina fosfatasa *in vivo (Virshup y Shenolikar, 2009*).

I.4.2. Proteínas Tirosina Fosfatasas

Las proteínas tirosina fosfatasas conforman una familia de enzimas con un origen evolutivo común y una estructura diversa, con un sitio catalítico conservado (*Charbonneau y Tonks, 1992; Stoker AW., 2005; Tonks NK., 2006*).

Un grupo de proteínas tirosina fosfatasas desfosforilan únicamente residuos de tirosina y conforman el grupo de las PTPs "clásicas" (*Protein Tyrosine Phosphatases,* PTPs). Otro grupo de tirosina fosfatasas son enzimas que exhiben actividad dual, ya que desfosforilan tanto residuos de serina/treonina como de tirosina. A estas enzimas se las denomina proteínas fosfatasas de actividad dual (*Dual Specficity Phosphatases,* DSPs) (*Dickinson y Keyse, 2006; Camps y col., 2000*). Aunque pertenecen a la misma familia, estos dos grupos de enzimas presentan poca homología de secuencia excepto en los residuos claves dentro del sitio catalítico.

I.4.2.a. Proteínas PTPs "clásicas" o PTPs

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

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.

La dimerización es un mecanismo regulatorio de la actividad de las PTPs de tipo receptor, al igual que lo que ocurre con los RTKs. Se ha detectado la formación de dímeros de estas enzimas y que esta dimerización puede bloquear la actividad catalítica de las mismas (*Bilwes y col., 1996*).

Con respecto a los mecanismos post-traduccionales de regulación, es 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 (*Stoker AW., 2005; Tonks NK., 2006*). Aunque en condiciones basales las PTPs exhiben marcada actividad, la fosforilación inducida por ligandos puede regular esta actividad por al menos dos mecanismos diferentes: por modificar los parámetros cinéticos y/o por dirigir la interacción con su ligando (*Garton y Tonks, 1994; Wang y Bixby, 1999*).

I.4.2.b. Proteínas Fosfatasas de Actividad Dual

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

Uno de estos subgrupos esta formado por las enzimas Cdc (*Cell Division Cycle*). Cdc25A es uno de los reguladores más importantes del ciclo celular. Esta enzima remueve la fosforilación inhibitoria de las CDKs, tales como CDK2, CDK4 y CDK6, promoviendo la actividad de las CDKs hacia la progresión del ciclo celular. Cdc25 actúa también como regulador de la apoptosis (*Shen y Huang, 2012*).

En el contexto de este trabajo, el subgrupo de fosfatasas duales de mayor relevancia es del de las MAP quinasas fosfatasas (MKPs), enzimas que catalizan la desfosforilación de los miembros de la familia de las MAPKs (*Dickinson y Keyse, 2006)*. En la sección siguiente describiremos detalladamente este tipo de fosfatasas duales.

I.4.3. MAP quinasa fosfatasas (MKPs)

En mamíferos, la familia de las MKPs comprende una decena de miembros. En base a la homología de secuencia, estructura proteica, especificidad por sustrato y

localización subcelular, se los clasifica en tres grandes grupos: el primero, tipificado por MKP-1, comprende enzimas nucleares rápidamente inducibles por factores de crecimiento o señales de estrés (*Keyse y Emslie, 1992; Rohan y col., 1993*). Estas enzimas están conformadas por 300 a 400 aminoácidos, no presentan secuencias de localización nuclear clásicas (*Nuclear Localization Sequence*, NLS) pero sí presentan al menos un motivo leu-x-x-leu-leu (o motivo LXXLL) en el extremo N-terminal que funciona como tal. Este motivo está involucrado en la interacción con receptores nucleares y por lo tanto en el transporte al núcleo (*Kawajiri y col., 2003; Wu y Bennett., 2005*). A este grupo también pertenecen MKP-2 y PAC-1 (*Phosphatase of activated cells* o DUSP-2). El segundo subgrupo, tipificado por MKP-3, incluye predominantemente enzimas citosólicas, debido a que presentan secuencias de exportación nuclear (*Nuclear Export Sequence*, NES), y cuyos transcriptos son inducidos por estímulos específicos, pero no por estrés ambiental (*Groom y col., 1996; Dowd y col., 1998*). El tercer grupo incluye a MKP-5 y MKP-7. Estas proteínas son más grandes que las de los otros subgrupos y se caracterizan por desfosforilar 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 (*Tanoue T., 2001*) (Figura 2).

Con respecto a la especificidad de sustrato cabe mencionar que MKP-1 y MPK-2 son capaces de desfosforilar a los miembros de los tres subgrupos de MAPKs, mientras que MKP-3 es específica para ERK1/2 (*Boutros y col., 2008*). Es importante mencionar que las MKPs que son arquetipos de la familia de las MKP, es decir MKP-1, MKP-2 y MKP-3, son producto de genes denominados también DUSP1, DUSP4 y DUSP6 (*Dual specificity protein phosphatase*), respectivamente.

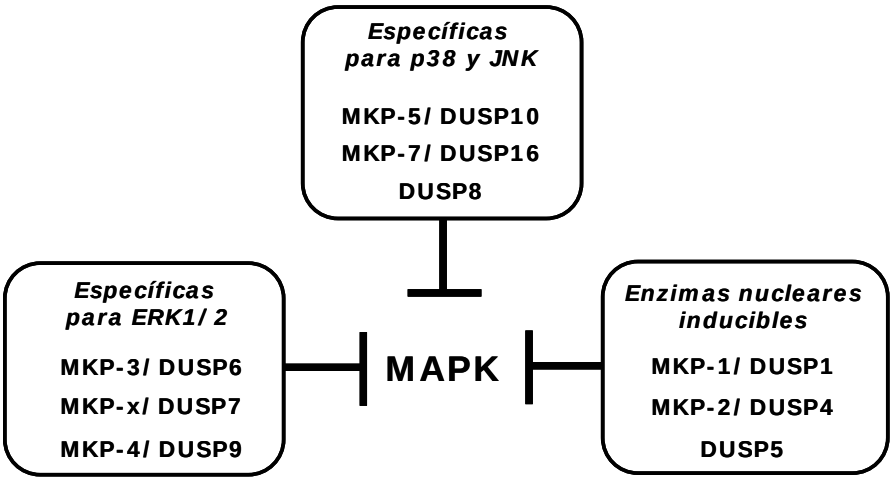


Figura 2. Clasificación general de las MKPs: De acuerdo a su localización subcelular, especificidad de sustrato y regulación, se distinguen tres grandes grupos de MKPs.

I.4.3.a. Estructura de las MKPs

Las MKPs tienen un peso molecular que varía entre 34 y 69 kDa. Están compuestas por dos dominios: el dominio catalítico con actividad de fosfatasa dual (*Dual Specificity Phosphatase,* DSP) que se encuentra en el extremo C-terminal y el sitio de unión a las MAPKs, (*MAP Kinase Binding domain,* MKB) que se encuentra ubicado en la porción N-terminal (Figura 3).

Con respecto al DSP, existe una homología mayor al 80% entre los distintos miembros de la familia de las MKPs. Este dominio está constituido por aproximadamente 140 aminoácidos y posee una secuencia de 9 aminoácidos (his-cys-x-x-gly-x-x-arg-ser) involucrada en la catálisis (*Dickinson y Keyse, 2006*). El dominio MKB de las MKPs contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente, incluidos dentro de una región hidrofóbica, responsables de la interacción con las MAPKs (*Tanoue y col., 2000; Tanoue y col., 2002*).

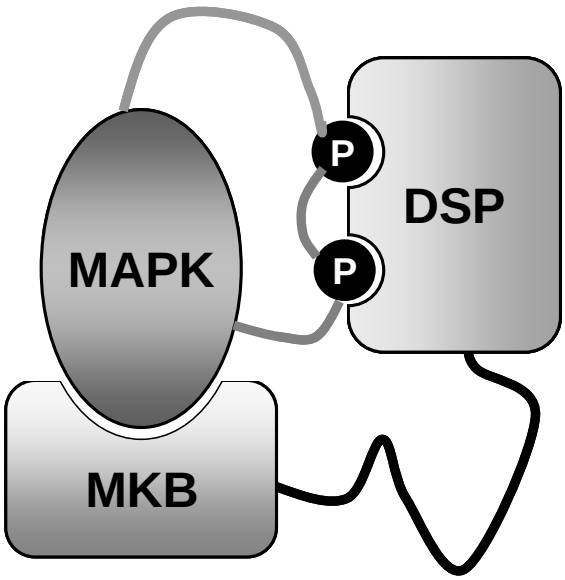


Figura 3. Interacción entre MKP y su sustrato. El esquema ilustra la interacción entre la MKP y su sustrato a través del motivo MKB.

El dominio MKB juega un rol fundamental en la regulación de la especificidad de sustrato a través de interacciones de anclaje con las MAPKs. Más aún, se ha demostrado que varias MKPs son activadas por la unión al sustrato a través de su dominio MKB (*Castelli y col., 2004; Farooq y col., 2003*). La unión de la MAPK

fosforilada al dominio MKB altera la estructura del dominio DSP. Este cambio conformacional, junto con la interacción del dominio catalítico con la MAPK, causa un incremento en la actividad catalítica de MKP-3 (*Zhou y col., 2001*).

La MKP-1 presenta, además de los sitios MKB y DSP, un sitio de unión para ERK (*Docking site for ERK*, DEF). Los dominios estructurales de MKP-1 se muestran en la figura 4. Por otro lado, las MKPs citosólicas, como MKP-3, MKP-4 y MKP-x, presentan entre el dominio amino terminal y el carboxilo terminal un interdominio conservado entre los miembros del grupo (Figura 4).

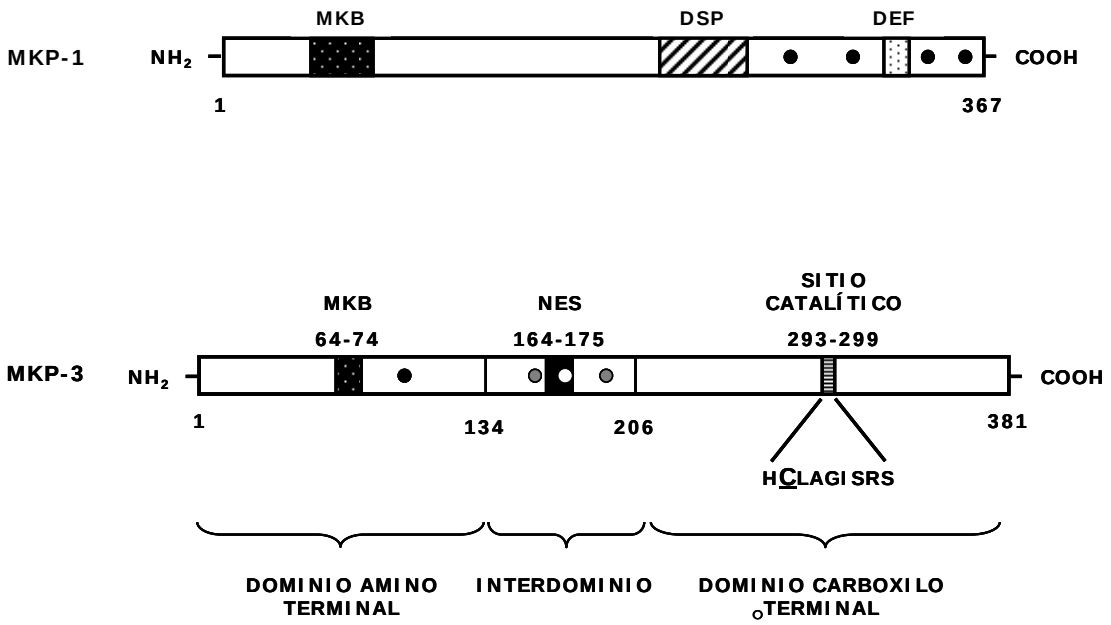


Figura 4. Dominios estructurales de las MKPs humana y sitios de fosforilación. Arriba: La MKP-1 humana tiene un dominio DEF *(Docking site for ERK*) o motivo FxFP que se encuentra entre los residuos 339-342, rodeado de 4 sitios consenso de fosforilación por ERK (S296, S323, S359, y S364 (*círculos negros*). También se muestran los dominios MKB (*MAP Kinase Binding domain*) y el dominio catalítico DSP (*Dual Specificity Phosphatase*) (*Lin y Yang, 2006*). **Abajo**: La MKP-3 humana presenta un dominio MKB entre los aminoácidos 64 y 74 y un dominio NES (*Nuclear Export Sequence*) entre los aminoácidos 164 y 175. Las MKPs citoplasmáticas conservan un interdominio entre los dominios amino y carboxiterminal (en MKP-3, entre los aminoácidos 134 y 206). El sitio catalítico se encuentra en el extremo carboxilo terminal entre los aminoácidos 293 y 299, de estos nueve residuos, la cisteína resulta esencial para la catálisis. En el esquema se indican los sitios de fosforilación: la S174 (círculo blanco) involucrado en la degradación de MKP-3 inducida por PDGF (*Jurek y col., 2009*), los residuos S159 y S197 (círculos grises) involucrados en la degradación de MKP-3 inducida por suero (*Marchetti y col., 2005*) y el residuo T92 (círculo negro) corresponde a un sitio de fosforilación por PKA de alto *score*.

I.4.3.b. Regulación transcripcional y post-traduccional de las MKPs

Una de las características de las MKPs nucleares es su rápida inducción transcripcional por factores de crecimiento o distintos tipos de estrés. Por ejemplo, la expresión de la fosfatasa MKP-1 está regulada por múltiples estímulos, tales como EGF (*Ryser y col., 2002*), ácido araquidónico (*Metzler y col., 1998*), estrés (*Li y col., 1999*), glucagon (*Schliess y col., 2000*), glucocorticoides (*Clark AR., 2003*) y LH (*Brion y col., 2011*), entre otros. La fosfatasa PAC-1 es inducida por mitógenos en células B y T humanas (*Rohan y col., 1993*). La expresión de MKP-2 es incrementada por diversos estímulos comos factores de crecimiento (*Misra-Press y col., 1995*), ácido retinoico (*Palm-Leis y col., 2004*), estrés oxidativo (*Wang y col., 2007*), senescencia (*Torres y col., 2003*) y GnRH (*Gonadotropin releasing hormone*) (*Zhang y col., 2001*). Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la activación del RLH conduce a la inducción de MKP-2 en células de Leydig (*Gómez y col., 2013*).

Dependiendo del tipo celular, el mecanismo de inducción de las MKPs involucra la actividad de varias quinasas, entre las que podemos mencionar a PKA y las MAPKs. Esto se condice con la presencia de sitios CRE (*cAMP response elements*) y sitios AP-1 (*Activator Protein 1*) en los promotores de los genes de las MKPs. En nuestro laboratorio se ha demostrado la participación de PKA en la inducción de MKP-1 por ACTH en células adrenocorticales (*Bey y col., 2003*) y en células de Leydig MA-10 por acción de la hormona hCG (gonadotrofina coriónica humana, hormona que se une al receptor de LH) (*Brion y col., 2011*). En células adrenocorticales, la preincubación con un inhibidor de PKA bloquea sólo parcialmente el incremento en los niveles del ARNm de MKP-1 alcanzados por ACTH. Este resultado, sumado a que ACTH dispara la activación tanto de PKA como de PKC, sugiere que PKC tiene un rol en la inducción de MKP-1 por ACTH. En células de Leydig, en cambio, la estimulación con hCG o con su segundo mensajero (AMPc) produce efectos cuantitativamente similares sobre la inducción de MKP-1, lo que implica que eventos independientes de PKA tienen poco efecto sobre la inducción de la fosfatasa. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de Raf también participa en la inducción de MKP-1. Por ejemplo, en fibroblastos de ratón, la activación de Raf-1 promueve tanto la activación de ERK1/2 como la inducción de MKP-1 y MKP-2. Más aún, la presencia del compuesto PD98059, un inhibidor de MEK1/2, disminuye notablemente los niveles de estas fosfatasas demostrando la participación de ERK1/2 en este proceso (*Brondello y col., 1997*).

En cuanto a las MKPs citoplasmáticas un ejemplo lo constituye la isoforma MKP-3, una enzima que se expresa constitutivamente en algunos tipos celulares y en otros es inducible por factores de crecimiento tales como el FGF y el factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*; NGF) (*Camps y col., 1998*). Existen

ejemplos que muestran una regulación recíproca entre ERK1/2 y MKP-3. La fosforilación y la activación de ERK1/2 se produce normalmente a través de la estimulación de la cascada Ras/Raf/MEK1/2. MEK1/2 es altamente específica para la fosforilación y la activación de ERK1/2. La magnitud y la duración de la actividad de ERK son determinadas por la actividad de la quinasa que la fosforila, MEK1/2, y las fosfatasas que la desfosforilan. Los niveles de MKP-3 están regulados, al menos en una serie de sistemas analizados, por ERK1/2 ya que éstas pueden aumentar los niveles del ARNm de MKP-3. Por ejemplo, en fibroblastos se ha demostrado que la estimulación con FGF produce la activación trancripcional del gen DUSP6/MKP-3 mediante un mecanismo dependiente de la actividad de ERK (*Ekerot y col., 2008*). Incluso se ha demostrado que la vía MEK/ERK está involucrada en el aumento de la estabilidad del ARNm bajo condiciones de hipoxia (*Bermúdez y col., 2011*). Por otro lado, los niveles de la proteína MKP-3 también pueden ser modificados mediante mecanismos dependientes de ERK. Por ejemplo, en hepatocitos la estimulación con insulina promueve la degradación de MKP-3 via ERK (*Feng y col., 2012*). Por lo tanto los niveles de proteína MKP-3 están determinados, al menos en parte, por el balance entre dos efectos contrapuestos y dependientes de ERK: aumento de los niveles del ARNm y disminución de los niveles de la proteína (Figura 5).

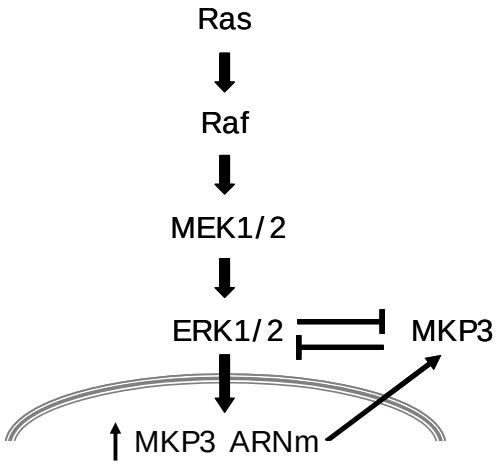


Figura 5. Regulación recíproca entre ER1/2 y MKP-3. La activación de la cascada Ras/Raf/MEK1/2 lleva a la fosforilación y activación de ERK1/2. La activación de ERK1/2 promueve la expresión génica de MKP-3 con el consiguiente incremento de la proteína. MKP-3 inactiva a ERK1/2 mientras que estas quinasas promueven la fosforilación y degradación de MKP-3.

Dentro de las MKPs, 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. Se postula que la diferente cinética de inducción de las fosfatasas 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 (*Roberson y col., 2005*). Por otra parte, dado que MKP-1 y MKP-2 regulan la actividad de ERK en el núcleo, mientras que MKP-3 lo hace en el citoplasma, la regulación de estas tres enzimas resulta clave para ejercer un control temporal y espacial estricto de ERK1/2.

Está documentado que algunos miembros de la familia de las MKPs también se regulan a nivel post-traduccional. Estudios realizados en fibroblastos de ratón han demostrado que la fosforilación de MKP-1 por ERK1/2 en los sitios S359 y S364 reduce el grado de ubiquitinación de MKP-1 promoviendo de esta forma su estabilización (*Brondello y col., 1999*). En contraposición a esto, existe un trabajo que demuestra que la activación de ERK1/2 induce la degradación de MKP-1, más aún, la inhibición de ERK1/2, disminuye notablemente la ubiquitinación de esta fosfatasa y su degradación por el proteosoma (*Choi y col., 2006*). Estas discrepancias se pueden explicar por los hallazgos del grupo de Lin y Yang obtenidos en una línea celular humana. Este grupo demostró que la fosforilación por ERK en los sitios S296 y S323 promueve la degradación de MKP-1 (Figura 4) (*Lin y Yang, 2006*). En células de Leydig, hCG promueve la fosforilación de MKP-1 en S359 y S364 incrementando su estabilidad (*Brion y col, 2011*), aunque resultados preliminares sugieren que la estimulación también promueve la fosforilación en los sitios de inestabilidad, es decir en S296 y S323. Por otro lado, en células de Leydig la estimulación con hCG o AMPc también estabiliza la proteína MKP-2. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con MKP-1, esta modificación no depende de ERK1/2 (*Gómez y col, 2013*). Actualmente estamos analizando si hCG/AMPc promueve la estabilización de MKP-2 a través de la fosforilación en una serina localizada en el dominio NLS1 y en el contexto de un sitio de fosforilación por PKA de alto *score*. También se ha descripto la regulación de MKP-3 por modificación covalente. Por ejemplo, en fibroblastos de hámster la estimulación con suero induce la fosforilación de MKP-3 y su posterior degradación por el proteosoma de manera dependiente de MEK1/2-ERK1/2 (*Marchetti y col., 2005*).

De estos trabajos podemos concluir que uno de los mecanismos de regulación post-traduccional de las MKPs es la fosforilación, en particular por acción de ERK1/2.

Sin embargo, los efectos de esta modificación son variables, ya que dependen del residuo fosforilado, del estímulo que promueve esta modificación y del tipo celular.

Es importante mencionar que las MKPs presentan sitios consenso para diferentes modificaciones covalentes en sitios conservados. Sin embargo hasta el presente se ha documentado la ocurrencia *in vivo* sólo de la fosforilación y la acetilación (*Boutros y col., 2008*). Se demostró que la estimulación de macrófagos con lipopolisacáridos (LPS) lleva a la acetilación de MKP-1 en una lisina ubicada en el dominio de anclaje a MAPKs (K57). La acetilación en este residuo incrementa notablemente la afinidad de MKP-1 por su sustrato p38 y esto conduce a una disminución en los niveles de p38 activada (*Cao y col., 2008*). No obstante no se ha analizado si la acetilación de MKP-1, o MKPs en general, se asocia con un cambio en la estabilidad de la proteína

I.4.3.c. Mecanismo de acción

Se han propuesto varios modelos que explican el mecanismo por el cual las MKPs ejercen su función de una manera espacio-temporal concertada. En el caso de las isoformas nucleares, como MKP-1 y MKP-2, se propone que cuando las fosfatasas se inducen y translocan al núcleo, su nivel en ese compartimento aumenta y se inicia una competencia con los sustratos de las MAPKs: las fosfatasas y los sustratos compiten por la unión a la quinasa. Este evento serviría para atenuar la transcripción de genes dependiente de MAPK de dos formas: primero, impidiendo la unión de las MAPK a sus sustratos e 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.

Para las isoformas citoplasmáticas como MKP-3 se propone que la interacción con su sustrato no sólo contribuye a la desfosforilación del mismo sino que también contribuye a la re-localización del mismo en el citoplasma. La interacción entre MKP-3 y ERK evita la translocación de ERK al núcleo y consecuentemente la fosforilación de sus sustratos nucleares (*Karlsson y col., 2004*).

Por lo tanto, las MKPs regulan los procesos en los que participan las MAPKs no sólo 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. Este mecanismo de inhibición de las MAPKs explicaría la existencia de las MKPs de la familia STYX. Estas MKPs son enzimas que

contienen una mutación puntual en el dominio DSP que las hace catalitícamente inactivas (*Wishart y Dixon, 1998*) pero mantienen el dominio N-terminal donde se encuentra el sitio de anclaje a MAPKs. Por lo tanto estas fosfatasas podrían regular también la actividad de las MAPKs por competencia con los sustratos de éstas.

I.4.3.d. La participación de MKPs en el control de la actividad celular

Las MKPs contribuyen a la regulación de procesos biológicos tan diversos como la proliferación celular, el desarrollo, la apoptosis, la diferenciación y la inflamación. En síntesis, todo proceso regulado por MAPKs es susceptible a la modulación por MKPs. Este hecho ha favorecido un incremento significativo del estudio de estas enzimas en los últimos años.

Por ejemplo, dado el rol relevante de las MAPKs en la proliferación celular -y consecuentemente en la transformación maligna- es esperable la contra regulación por MKPs. En este contexto, MKP-3 es considerada como proteína antitumoral por su capacidad de desfosforilar específicamente a ERK1/2 (*Zeliadt y col., 2008*). Por otro lado la expresión de MKP-1 está aumentada en varios tipos de tumores humanos y se demostró que su sobreexpresión protege a estas células de la apoptosis mediada por distintos agentes antitumorales como el cisplatino (*Sanchez-Perez y col., 2000*), por inhibidores del proteosoma (*Small y col., 2004*) y por radiación UV (*Franklin y col., 1998*). En células normales, también se observó el rol antiapoptótico de MKP-1 principalmente por su capacidad de inactivar las MAPKs p38 y JNK. Sin embargo, también se ha observado que esta fosfatasa puede inactivar otro miembro de la familia de MAPKs, ERK1/2, y esto resulta en la inhibición del ciclo celular. Estudios realizados utilizando fibroblastos provenientes de ratones *knock out* para el gen de MKP-1 mostraron una disminución de la velocidad de proliferación debida a un aumento de la muerte celular (*Wu y col., 2005*). Estudios recientes han subrayado la importancia de MKP-1, MKP-5 y PAC-1 en la regulación de la inflamación durante la respuesta inmune innata. En macrófagos, la interacción de los receptores TLR (*Toll-like receptor)* con LPS en la membrana celular desencadena una respuesta inflamatoria que involucra la activación de dos vías intracelulares, la vía de NFκB y la vía de las MAPKs, fundamentalmente p38 y JNK. Es por esto que se ha estudiado intensamente el rol de las MKPs en la regulación de este proceso. Ratones *knock out* para los genes de MKP-1 y PAC-1 mostraron ser más susceptibles a las infecciones con LPS que los ratones *wild type (Chi y col., 2006)*. Más aún, macrófagos derivados de estos animales mostraron aumento en las actividades de p38 y JNK y, como

consecuencia, niveles muy elevados de citoquinas proinflamatorias en respuesta a LPS (*Zhao y col., 2005*).

La fosfatasa MKP-3 ha sido caracterizada por su alta especificidad por ERK1/2 (*Zhao y Zhang, 2001*). MKP-3 desfosforila ERK1/2 por interacción proteína-proteína a través del dominio de unión N-terminal de ERK1/2. (*Nichols y col, 2000*). El aumento en los niveles basales de ERK1/2 fosforilada en corazón de ratones deficientes en MKP-3 afianza el concepto de la especificidad de MKP-3 por ERK1/2 (*Maillet y col, 2008*).

Se ha propuesto que las MKPs también pueden modificar la actividad celular mediante una acción sobre sustratos que no son MAPKs (*Boutros y col., 2008*). Recientemente se ha demostrado que MKP-3 interactúa con el factor de transcripción FOXO1 (*Forkhead box protein O1*) en el citoplasma, promoviendo su desfosforilación y su translocación al núcleo, con la subsecuente activación de genes claves en la gluconeogénesis (*Jiao y col., 2012; Wu y col., 2010*). Este novedoso mecanismo resulta de sumo interés ya que FOXO1 participa en la regulación no sólo de genes relacionados con el metabolismo sino también con numerosos genes relacionados con un amplio abanico de procesos celulares. En particular, FOXO1 participa en el control del arresto del ciclo celular, a través de la inducción de un inhibidor del ciclo celular: p21 (*Roy y col., 2010*). Más aún, FOXO1 regula negativamente la proliferación de células de la granulosa del ovario y su diferenciación inducida por FSH (*Park y col 2005*). En células gonadotrofas, FOXO1 inhibe la transcripción de LH inducida por Gn-RH (*Arriola y col., 2012*).

II. LA CÉLULA DE LEYDIG BAJO EL CONTROL DE LA HORMONA TRÓFICA COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE MKPs

II.1. Síntesis de esteroides y tejidos esteroidogénicos

El colesterol es el precursor común de un gran número de hormonas esteroideas sintetizadas en diferentes tejidos, como corteza adrenal, ovario, testículo, placenta e incluso el tejido nervioso. Estas hormonas tienen diferentes acciones biológicas y de acuerdo a ellas se clasifican como progestágenos, corticoides (gluco y mineralocorticoides), andrógenos y estrógenos. Estas hormonas regulan el metabolismo de glúcidos (glucocorticoides), balance hidrosalino (mineralocorticoides), la diferenciación sexual, el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (andrógenos, estrógenos), la implantación y la embriogénesis (progestágenos). La esteroidogénesis es un proceso altamente regulado, lo que garantiza un nivel apropiado de los diferentes esteroides en el momento adecuado. Esto contribuye al funcionamiento armónico del organismo.

II.1.1. Biosíntesis de hormonas esteroideas

La síntesis de esteroides depende de la disponibilidad de colesterol, el cual debe ser rápidamente transportado hacia la mitocondria, donde se inicia este proceso. El colesterol de los depósitos intracelulares puede provenir de la sangre transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) o de baja densidad (LDL), y en menor proporción, de la síntesis celular *de novo* a partir de acetato. El colesterol obtenido es almacenado, como colesterol esterificado con ácidos grasos, en forma de gotas lipídicas intracelulares.

La primera etapa de la vía de síntesis de esteroides consiste en la conversión de colesterol a pregnenolona (P5), un esteroide de 21 C, e isocaproaldehído (*Dorfman y col 1957*) (Figura 6). Esta reacción, que comprende dos hidroxilaciones y la escisión de la cadena lateral del colesterol, es catalizada por un complejo enzimático localizado en la membrana mitocondrial interna denominado complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol (citocromo P450 S*ide Chain Cleavage* o P450scc) (*Simpson y col., 1966; Lambeth y col., 1987*).

La P5 formada es la precursora en la síntesis de todas las hormonas esteroideas, la cual ocurre en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático, requiriéndose para ello la acción sucesiva de hidroxilasas y 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 Δ5 a Δ4. Estas reacciones son llevadas a cabo por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), enzima localizada en el retículo endoplasmático. También se ha encontrado actividad de esta enzima en mitocondrias (*Sulimovici y col., 1973; Van der Vusse y col., 1974*), que constituye un 15–40% de la actividad 3β-HSD celular total.

Distintos tejidos secretan distintos tipos de esteroides. Este hecho radica en la expresión tisular diferencial de varias enzimas que convierten P5 en las diversas hormonas esteroideas. Por ejemplo, la conversión de P5 y P4 en gluco y mineralocorticoides requiere la hidroxilación en posición 21, lo cual ocurre en la corteza adrenal. En tejidos con baja o nula expresión de la enzima 21 hidroxilasa no se sintetizan esos esteroides pero, en cambio, estos tejidos son capaces de producir otros esteroides.

Los esteroides mayoritarios sintetizados en las gónadas son los andrógenos androstenediona y testosterona, y los estrógenos estradiol y estrona. Los andrógenos son producidos por el testículo mayoritariamente y contienen 19 átomos de carbono, mientras que los estrógenos, producidos por el ovario, contienen 18 C. Éstos se sintetizan a partir de los primeros por pérdida del grupo metilo angular C-19 y la formación de un anillo aromático, reacción que realiza la enzima aromatasa. Los andrógenos androstenediona y testosterona son transformados a los estrógenos estrona y estradiol respectivamente. La testosterona, que se produce en las células de Leydig, es transformada a dihidrotestosterona en sus células blanco. En la figura 6 se esquematizan las reacciones que participan en la síntesis específicamente de testosterona, dado la vinculación de este trabajo con la esteroidogénesis en células de Leydig.

Dos modelos experimentales de amplio uso para el estudio de la regulación de la esteroidogénesis son las células de Leydig de la línea MA-10 y las células adrenocorticales de la línea Y1. Estas células no tienen la maquinaria enzimática completa para producir los esteroides de las correspondientes células progenitoras normales, es decir testosterona y cortisol (o corticosterona en roedores), en cambio ambas producen P4 como esteroide mayoritario.

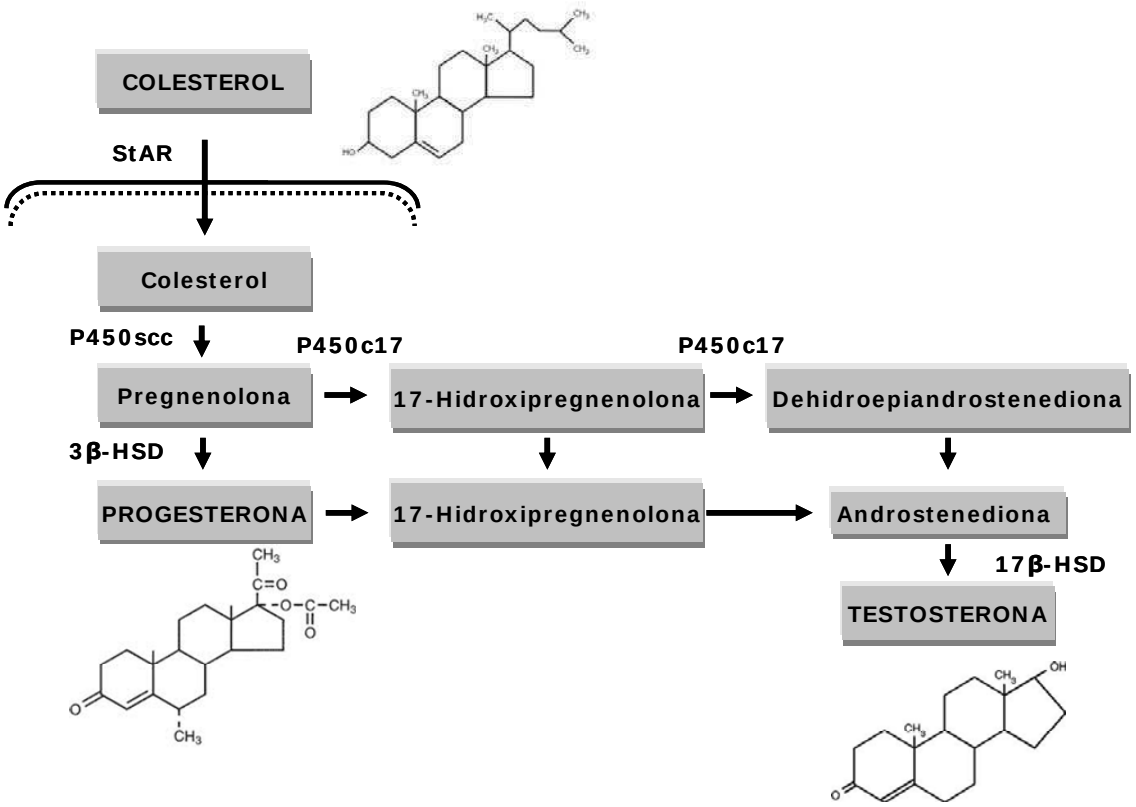


Figura 6. Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroideas. Referencias: P450scc: complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol; 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450c17: 17α-hidroxilasa/17,20-liasa; 17β-HSD: 17β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa.

II.1.2. La célula de Leydig y síntesis de andrógenos

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 germinales, que darán origen a los espermatozoides, y las células de Sertoli que brindan soporte metabólico y estructural (*Fawcett DW., 1975*) (Figura 7). 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 además, desarrollan y mantienen todo el tracto genital masculino y las características sexuales externas (*Mooradian y col, 1987*).

El mantenimiento de la función testicular normal depende de la secreción hipotalámica pulsátil de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que, a su vez,

activa la secreción también pulsátil de las hormonas hipofisarias folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), llamadas comúnmente gonadotropinas. Ambas gonadrotrofinas actúan sobre el testículo iniciando la espermatogénesis (FSH) y la producción de testosterona (LH).

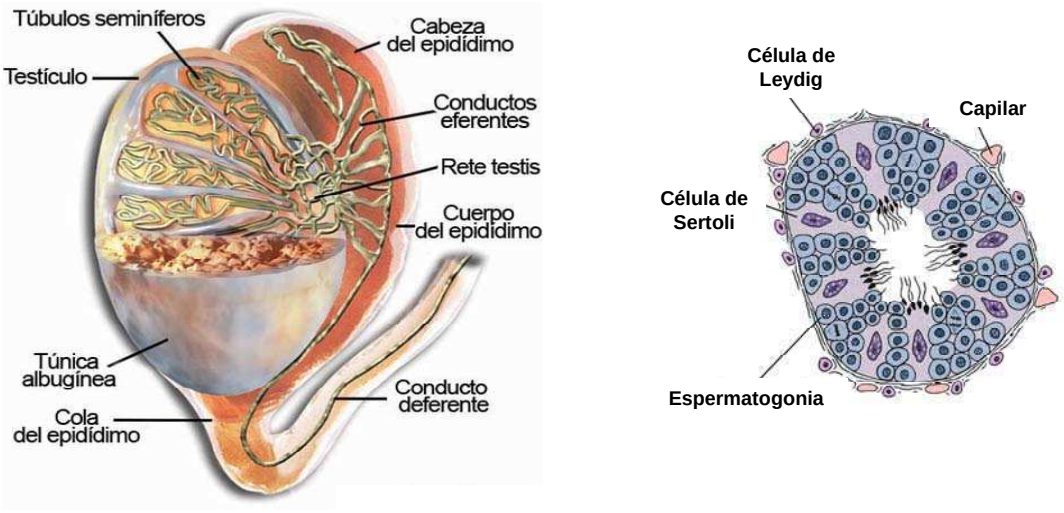


Figura 7: Testículo de mamífero. Partes del testículo de mamífero (izquierda). Detalle de la organización celular del túbulo seminífero (derecha).

II.2. Hormonas esteroidogénicas y su mecanismo de acción

II.2.1. Hormonas esteroidogénicas

Las hormonas esteroidogénicas promueven la síntesis y liberación de esteroides en sus células blanco. Las células de la adenohipófisis producen las hormonas LH y FSH, glicoproteínas con peso molecular aproximado de 32 kDa constituidas por una subunidad α común a ambas, y una subunidad β característica de cada una (*Pierce y col., 1981*). Esta estructura es compartida también con las hormonas tirotrofina hipofisaria (TSH) y gonadotrofina coriónica (CG) de origen placentario. La especificad de estas hormonas está determinada por la subunidad β. Esta subunidad es reconocida por el receptor pero, para eso, 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 en el ovario está sostenida por FSH. Otra hormona de origen hipofisario es la ACTH, que regula la producción de glucocorticoides en la corteza adrenal. La producción de

mineralocorticoides en la corteza adrenal está bajo el control de angiotensina II, K^+ y ACTH. La hormona CG estimula la síntesis de progesterona por el cuerpo lúteo y por la placenta durante el embarazo.

Es importante destacar, en el contexto de este trabajo, que la hormona CG es reconocida por el receptor de LH desencadenando la misma respuesta fisiológica y a través de los mismos mecanismos de transducción de señales. Estas características permiten el uso indistinto de estas hormonas en los estudios experimentales que involucran dichas hormonas. Además, por razones prácticas que tienen que ver con la obtención de CG, normalmente se usa la isoforma humana (hCG).

II.2.2. La activación del receptor del LH y las quinasas involucradas

Las hormonas LH/CG se unen a sus receptores específicos de la membrana celular. Estos pertenecen al tipo 7TMS y presentan el extremo amino en el espacio extracelular y el extremo carboxilo en el espacio citoplasmático (*Lefkowitz RJ, 1993*).

La unión de LH a su receptor (RLH) produce la activación de la adenilil ciclasa, sistema efector activado por una subunidad estimulatoria de la proteína G (Gs). Producto de esta activación es el aumento en los niveles intracelulares de AMPc, segundo mensajero que conduce a la activación de PKA (*Cooke y col. 1976, Podesta y col. 1976, Podesta y col. 1978*). Este sistema es quizás el más caracterizado dentro del mecanismo de señalización de LH.

Actualmente se sabe que un ligando puede disparar más de un mecanismo de transducción de señales. Cada uno de estos mecanismos estaría involucrado en la regulación de actividades celulares específicas, de manera que esta diversidad de señales permite un control más fino de las funciones celulares. Como se verá seguidamente, la activación del RLH conduce a la activación de diferentes quinasas.

El RLH fue uno de los primeros receptores asociados a proteínas G descripto como capaz de activar independientemente dos caminos de señalización. Aunque está bien caracterizado que la activación del RLH promueve la activación de Gs y la concomitante activación de la adenilil ciclasa, no existe consenso en cuanto a la identidad de la proteína G que media la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la acumulación de fosfoinosítidos. A pesar de estas discrepancias se conoce que la activación del RLH produce la activación de PKC (*Stocco y col. 2005, Ascoli y col. 2002*).

El RLH también induce un aumento en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático. En células de Leydig de la línea MA-10, este aumento de Ca^{2+} modularía la actividad de la CaMK, cuya actividad es necesaria para eventos transcripcionales relacionados con la activación de la esteroidogénesis (*Abdou y col., 2013*).

La hormona ACTH provoca la activación de un camino de señalización similar al disparado por LH. ACTH no sólo activa PKA sino que también PKC. En células adrenocorticales bovinas, ACTH produce un aumento de la actividad de PKC de manera dependiente del tiempo y la dosis de exposición (*Vilgrain y col., 1984*). Se ha demostrado que la estimulación con ACTH de las células adrenocorticales de la línea Y1 produce un cambio en la expresión de alrededor de mil genes, los cuales son regulados por PKA y por PKC (*Schimmer y col., 2006*). En general, los genes cuya expresión se ve aumentada son genes relacionados con la esteroidogénesis y el metabolismo, mientras que aquellos cuya expresión disminuye son genes referidos a la proliferación celular (*Schimmer y col., 2006*).

Otra quinasa que se activa en respuesta al estímulo con LH/CG es AKT. Tai y colaboradores demostraron que la activación del RLH inhibe la apoptosis en cultivos primarios de células de Leydig de ratas inmaduras (*Tai y col., 2009*), aunque el mecanismo detallado de la activación de esta quinasa en células de Leydig aún no está totalmente dilucidado.

Como ocurre en células de Leydig, en células de la teca del ovario la activación del RLH modula la producción de andrógenos a través de la vía de PKA y de la activación de AKT (*Fukuda y col., 2009*).

Shiraishi y Ascoli han demostrado que, en células de Leydig de la línea MA-10, la activación de RLH lleva a la fosforilación de Shc (un adaptador que une y fosforila residuos tirosina en receptores de factores de transcripción) y a la formación del complejo Shc-Sos. Se ha visto que una mutante negativa para Shc inhibe la activación de Ras mediada por RLH y la consecuente fosforilación de ERK1/2. Además han demostrado que el receptor para EGF, presente en esta línea celular, es fosforilado luego de la activación de RLH. La quinasa Src sería responsable de la fosforilación de EGFR y Shc mediada por RLH, formando el complejo Shc-Sos. Este complejo sería el intermediario para la activación de Ras y, finalmente, la fosforilación de ERK1/2 (*Shiraishi y Ascoli, 2006*).

Otro evento asociado a la activación del RLH es la liberación de especies reactivas del oxígeno (EROS), que se originan por un camino de señalización dependiente de AMPc e involucra a la mitocondria como fuente de EROS. El aumento

de EROS provoca luego la activación de Ras, conduciendo así a la activación de ERK1/2 (*Tai y Ascoli, 2011*).

II.3. Acción biológica de LH en células de Leydig

II.3.1. Acción de LH sobre la proliferación celular y apoptosis

Como ya hemos mencionado, la activación de un receptor puede activar varias vías de transducción de señales. En células de Leydig, la fosforilación de proteínas regulatorias a partir de la activación del RLH desencadena un incremento de la síntesis de esteroides, siendo la respuesta celular más notoria. Sin embargo, el RLH genera otras respuestas como la proliferación celular y la apoptosis.

LH es una hormona trófica, por lo tanto se entiende que LH controla la población de células testiculares. Hace muchos años se observó que, en ratas adultas tratadas en forma crónica con hCG, el volumen testicular se incrementa. Un estudio morfométrico demostró que esto se debe al aumento en el número de células más que al aumento de tamaño de las mismas (*Christensen y Peacock, 1980*). Posteriormete se demostró que existen dos etapas proliferativas diferentes de las células de Leydig, en cuanto a la dependencia con la hormona LH. La proliferación durante el desarrollo fetal es independiente de LH, en tanto que la proliferación y diferenciación en células de Leydig post-natales es dependiente de esta hormona (*Baker y O'Shaughnessy, 2001*). En la rata la proliferación se incrementa notablemente (16 veces) en las primeras semanas de vida (entre el día 5 y el día 20) mientras que en la vida adulta aún continúa aunque en menor grado (*Baker y O'Shaughnessy, 2001).*

Estudios más recientes han explorado el papel de LH sobre la proliferación de células de Leydig y su relación con las vía de las MAPKs. Se ha reportado que ratones cuyas células de Leydig carecen de MEK1/2 no muestran deficiencias en el desarrollo sexual prenatal, pero en la adultez presentan hipoplasia de células de Leydig, hipogonadismo y pérdida de la fertilidad (*Yamashita y col., 2011*).

Existe gran cantidad de evidencia que implica al RLH como regulador de la cascada de señales mitogénicas en células de Leydig. La activación de ERK1/2 desencadenada por LH es un evento fundamental para la estimulación de la síntesis de esteroides, sin embargo esta vía está también implicada en la proliferación de dichas células (*Shiraishi y Ascoli, 2007*). Tai y colaboradores han demostrado que la activación del RLH inhibe la apoptosis en células de Leydig de rata y que este efecto es mediado por la actividad de ERK (*Tai y col., 2009*). Por lo tanto, la hormona LH

regularía la sobrevida de este tipo celular, ejerciendo un efecto sobre la proliferación y modulando los niveles de apoptosis.

Previamente mencionamos que la activación de AKT se vincula con la regulación de la proliferación celular y el metabolismo. En línea con ese concepto, ha sido demostrado un rápido incremento en la fosforilación de AKT en cultivos primarios de células de Leydig de rata inmadura estimuladas con hCG (*Tai y col., 2009*). Se postula que los efectos estimulatorios de LH sobre la población de células de Leydig adulta se deben a un aumento de la proliferación mediada por la activación de ERK1/2 y de AKT, y a una disminución de la apoptosis que es sólo dependiente de ERK1/2 (*Tai y col., 2009*).

II.3.2. Acción de LH sobre la esteroidogénesis

La estimulación del RLH provoca un aumento notable de la producción de esteroides a los pocos minutos del estímulo. Durante muchos años se ha propuesto que las acciones de las hormonas esteroidogénicas sobre la producción de esteroides pueden diferenciarse temporalmente en dos fases: aguda y crónica. La regulación aguda, sobre la cual nos referiremos a continuación, se extiende durante minutos luego de iniciado el estímulo. La regulación crónica ocurre en un período más extenso, del orden de horas. Los efectos crónicos de LH incluyen el incremento de la transcripción de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de esteroides (*Simpson y col., 1990*), manteniendo así la capacidad esteroidogénica celular. En contraste con lo que ocurre en la fase crónica, en la fase aguda el nivel de enzimas esteroidogénicas permanece constante (*Koritz y Kumar, 1970*).

A diferencia de las hormonas proteicas (que son almacenadas en vesículas secretorias), las hormonas esteroideas no se almacenan en cantidades apreciables dentro de las células. Es por ello que una respuesta esteroidogénica rápida o aguda requiere la síntesis *de novo* de esteroides. Los efectos agudos de la hormona LH se atribuyen principalmente a la fosforilación, dependiente de PKA, de proteínas regulatorias que afectan el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna. En la biosíntesis de esteroides, la reacción que transcurre más lentamente es la que corresponde a la conversión de colesterol a pregnenolona, catalizada por el complejo enzimático P450scc (*Karaboyas y Koritz, 1965*). Sin embargo, el efecto esteroidogénico agudo no está limitado por el mecanismo catalítico en sí, sino por el acceso de colesterol al sitio activo del complejo P450scc. Más específicamente, el paso limitante y hormonalmente regulado de la esteroidogénesis es el transporte de

colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna (*Jefcoate y col., 1987*) y éste ocurre en respuesta a la cascada de eventos de fosforilación desencadenada por la hormona 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 (*Karaboyas y Koritz, 1965, Jefcoate y col., 1987, Tuckey RC, 1992)* indicando que el complejo P450scc es completamente activo en ausencia del estímulo hormonal y que la disponibilidad de colesterol es el factor regulado hormonalmente.

- Función de la proteína StAR en la estimulación de la esteroidogénesis

La conexión entre la fosforilación de proteínas desencadenada por activación del RLH y el aumento de la producción de esteroides dio origen, en décadas pasadas, a una gran cantidad de trabajos que llevaron a la caracterización de péptidos o proteínas que se fosforilan en respuesta a la estimulación y que tienen la capacidad de modular el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna. Actualmente está ampliamente caracterizada la proteína que activa ese proceso, la proteína StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) (*Clark y col., 1994*). Esta es una proteína de 30 kDa capaz de estimular la transferencia de colesterol a la mitocondria. Se sintetiza como un precursor de 37 kDa y, por estimulación hormonal, se fosforila por acción de PKA y experimenta clivaje proteolítico secuencial para generar la proteína madura de 30 kDa que se acumula en la matriz mitocondrial (*Clark y col., 1994; Artemenko y col., 2001; Clark y Stocco, 1997)*. Mutaciones en el gen que codifica para la proteína StAR (STARD1) causan Hiperplasia Adrenal Lipoide Congénita (*Lin y col., 1995; Bose y col. 1996*), una rara y severa patología humana. Los individuos afectados con esta patología tienen una deficiente o nula capacidad de sintetizar todos los esteroides 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 esteroidogénesis (*Caron y col., 1997*).

- Regulación de la expresión de StAR

La expresión de StAR está finamente regulada hormonalmente (*Stocco y col., 2001; Manna y Stocco, 2005*). En particular, la hormona LH promueve un incremento tanto de los niveles de su ARNm como de la síntesis y fosforilación de la proteína (*Clark y Stocco, 1997; Clark y col., 1995*).

En células de Leydig y adrenocorticales, tanto la estimulación hormonal como el tratamiento con análogos del AMPc incrementan la síntesis *de novo* de la proteína StAR y la producción de esteroides, en una forma dependiente del tiempo y la concentración del estímulo. Dado que diversos trabajos han demostrado que el aumento en los niveles de ARNm precede al incremento en los niveles proteicos (*Manna y Stocco, 2005; Reinhart y col., 1999*), se deduce que la transcripción del gen de StAR es uno de los principales eventos sobre los cuales AMPc/PKA ejerce su acción regulatoria.

Ciertos factores de crecimiento, como el EGF y el factor de crecimiento símil insulina 1, pueden estimular la síntesis de esteroides en células de Leydig a través del incremento de la expresión de StAR, sin afectar los niveles de AMPc (*Castilla y col., 2008; Manna y col., 2006*). Al respecto, se ha demostrado que la vía de PKC podría ser relevante en la inducción del gen de StAR y esteroidogénesis por factores de crecimiento (*Stocco y col., 2005*).

En numerosos trabajos se ha abordado el estudio de la regulación transcripcional de StAR focalizando la atención en una variedad de factores de transcripción capaces de interactuar con el promotor correspondiente. Entre éstos se incluyen reguladores positivos, tales como SF-1 (*steroidogenic factor 1,* NR5A1), CREB/CREM (*cAMP response-element binding protein/CRE modulation protein*), SREBP (*sterol regulatory element binding protein*), NUR77 (*Nerve Growth Factor Induced* b*,* NR4A1), GATA-4, C/EBPb (*CCAAT/enhacer binding protein*), Sp1 y la familia de AP1 (*activator protein 1*), y reguladores negativos, como DAX-1 (*dosage-sensitive sex reversal-adrenal hipoplasia congenita critical region on the Xchromosome*) y YY1 (***y****ing and* ***y****ang 1*) (*Manna y col., 2003*). Los factores de transcripción mencionados se unen a la región proximal del promotor de StAR (250 nucleótidos anteriores al sitio de iniciación de la transcripción) y cooperan para controlar la expresión de este gen (*Manna y col., 2003*).

Las hormonas que regulan la esteroidogénesis regulan la expresión de StAR mediante su acción a nivel de la inducción y/o actividad de los factores de transcripción mencionados anteriormente. Sin embargo, debe mencionarse otro importante mecanismo regulatorio de la transcripción de StAR, el cual involucra la acetilación y metilación de las histonas unidas al promotor (*Hiroi y col., 2004; Rusovici y col., 2005*). Las modificaciones de las histonas influyen en la compactación de la cromatina, alterándola y permitiendo, de esta forma, la interacción con diversos factores de transcripción.

Uno de los factores de transcripción más ampliamente caracterizado en la regulación de StAR es el factor de transcripción SF-1. Este factor tiene un rol esencial en el desarrollo de tejidos esteroidogénicos. En células de Leydig MA-10 se ha demostrado un incremento significativo en la asociación del SF-1 al promotor de StAR a los 15 minutos del estímulo con AMPc. Pasado este tiempo, esta asociación disminuye notablemente para ir aumentando nuevamente en forma gradual hasta alcanzar un máximo a las 2 horas, que se mantiene luego de 4 horas de estimulación (*Hiroi y col., 2004*). Este patrón de unión al promotor sugiere que el SF-1 participa tanto en la iniciación de la transcripción como en el mantenimiento de la misma a largo plazo. Los cambios temporales de asociación de SF-1 al promotor de StAR son el resultado de modificaciones post-traduccionales, más precisamente fosforilaciones, las cuales modulan la asociación de este factor con proteínas (coactivadores o corepresores) que forman parte de la maquinaria de transcripción (*Desclozeaux y col., 2002; Hammer y col., 1999*). Se ha determinado que SF-1 fosforilado es menos susceptible a la acción de proteasas que en su estado desfosforilado. Se postula que la fosforilación del SF-1 induciría un cambio conformacional en su LBD (*ligand binding domain*) que promovería su compactación y evitaría su proteólisis.

El receptor nuclear NR4A1 o NUR77 es un factor de transcripción que está presente en varios tejidos, incluyendo testículo, ovario, músculo, timo, glándula adrenal y en el sistema nervioso central. Actualmente se sabe que es un importante regulador de la expresión génica en células esteroidogénicas, incluyendo células de Leydig (*Havelock y col., 2005; Zhang y Mellon, 1997*). NUR77 es clasificado como un gen de expresión temprana ya que se induce rápidamente por múltiples estímulos fisiológicos como Ca^{2+}, factores de crecimiento, prostaglandinas, neurotransmisores, hormonas (*Stocco y col., 2002; Roche y col., 1999; Martin y Tremblay, 2009; Martin y col., 2008; Davis y Lau, 1994*). La inducción de NUR77 en respuesta a LH/CG en células de Leydig también ha sido demostrada (*Song y col., 2001; Inaoka y col., 2008; Martin y Tremblay, 2009*). El mecanismo por el cual estas hormonas promueven la inducción, como también la activación por fosforilación, involucra una cascada de señales que en parte son desencadenadas por un aumento intracelular de Ca^{2+}. En ese mecanismo, la quinasa CaMKII tiene un papel relevante. Dado que se ha demostrado la participación de ERK1/2 en la inducción de NUR77 en otros sistemas (*Kovalovsky y col., 2002*), no se descarta la participación de las MAPKs en la acción de LH sobre la expresión de NUR77.

Como mencionamos previamente, en células de Leydig la estimulación del RLH conduce a la activación de ERK1/2. Se ha demostrado que el bloqueo de la activación de ERK1/2 promovida por AMPc inhibe la esteroidogénesis y la inducción de StAR en

células adrenocorticales Y1 y de Leydig MA-10 (*Gyles y col., 2001*). Se comprobó que la actividad de ERK es necesaria para la fosforilación del factor de transcripción SF-1, el cual debe estar fosforilado para promover la transcripción del gen STARD1. Aunque en células de Leydig de la línea MA-10 se demostró que la cascada de ERK1/2 está involucrada en la expresión de StAR (*Gyles y col., 2001*), la actividad de estas quinasas puede estimular o inhibir la expresión de StAR según el tipo de estímulo que origine su activación. Por ejemplo, la preincubación de las células con un inhibidor de ERK1/2, UO126, disminuye la expresión de StAR cuando el estímulo es PMA (éster de forbol, activador de PKC), pero la aumenta cuando el estímulo es AMPc/hCG (*Manna y Stocco, 2007*). Estos resultados contradictorios se atribuirían al hecho que la actividad de ERK1/2 modula en distinto grado dos eventos que producen efectos opuestos sobre la expresión de StAR: incrementa tanto la fosforilación y actividad de SF-1 como la expresión de DAX-1, un factor inhibitorio de la transcripción de StAR.

II.3.2.a. Participación de proteína fosfatasas en la acción de LH sobre la esteroidogénesis

La activación del RLH estimula la producción de esteroides a través de un mecanismo básicamente mediado por eventos de fosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina. Sin embargo las fosfatasas de proteínas, en particular las PTPs y los miembros de la familia de las MKPs tienen un rol relevante en este proceso. Tanto ACTH como LH/hCG regulan la actividad y/o expresión de estas enzimas a través de mecanismos dependientes de PKA y su actividad juega un papel importante en la acción biológica de estas hormonas

- La activación de PTPs en la inducción de StAR

La hormona LH/hCG produce la activación de tirosina fosfatasas o PTPs con la consiguiente desfosforilación de proteínas endógenas. ACTH promueve, vía PKA, la activación de tres PTP en adrenal de rata y promueve la desfosorilación endógena de proteínas (*Paz y col., 1999*). Una de estas proteínas es la paxilina, una proteína del citoesqueleto. La actividad de PTPs en la fracción soluble de zona fasciculata (ZF) de suprarrenal de rata se incrementa por tratamiento *in vivo* con ACTH o por la acción de un derivado permeable del AMPc en glándulas aisladas. Mediante un ensayo para la detección de actividad de tirosina fosfatasas en geles luego del análisis electroforético de las proteínas (SDS-PAGE), se determinó que este efecto de ACTH/AMPc involucra la activación de al menos dos proteínas, de 80 y 120 kDa (*Paz y col., 1999*). Incluso en

células de Leydig MA-10, la estimulación con LH/AMPc conduce a la activación de PTPs de similar peso molecular (*Cornejo Maciel y col., 2001*). Se identificó a la fosfatasa de 80 kDa que se activa por ACTH como PTP-1D y se demostró que su activación por ACTH en ZF ocurre por fosforilación. Experimentos de co-inmunoprecipitación y análisis de los inmunoprecipitados en geles para la detección de tirosina fosfatasas sugieren que ACTH promueve la interacción paxilina-PTP-1D. Inhibidores permeables de tirosina fosfatasas bloquean la síntesis de esteroides estimulada por hormona/AMPc (*Paz y col., 1999; Cornejo Maciel y col., 2001*) e interfieren con la inducción hormonal de StAR (*Paz y col., 2002; Poderoso y col., 2002*), por lo que se concluye que la desfosforilación de proteínas por PTPs activadas por hormonas esteroidogénicas es un requisito para la inducción de StAR y la esteroidogénesis.

En síntesis, los antecedentes presentados indican que LH, vía PKA, modula la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. La desfosforilación de proteínas regulatorias en residuos de tirosina es necesaria para la acción estimulatoria de la hormona sobre la esteroidogénesis.

- La inducción de MKPs por estimulación del RLH

Trabajos de nuestro y otros laboratorios han demostrado la regulación de la expresión de MKP-1 en células adrenocorticales. En nuestro laboratorio demostramos que la estimulación con ACTH o con un derivado permeable de su segundo mensajero (8Br-AMPc) promueve la inducción rápida y transitoria de MKP-1 en células adrenocorticales de la línea Y1. En estas células la inducción promovida por ACTH está mediada por mecanismos dependientes e independientes de PKA, ya que cuando se inhibe dicha quinasa el efecto promovido por la hormona no se bloquea totalmente (*Bey y col., 2003*). Sewer y Waterman también han demostrado un aumento en los niveles de MKP-1 en células adrenocorticlaes humanas de la línea H295R estimuladas con ACTH (*Sewer y Waterman, 2003*). Por otra parte también se ha comprobado que otra hormona esteroidogénica como Angiotensina II también provoca la inducción de MKP-1 en células adrenales bovinas (*Casal y col., 2007*).

En células de Leydig de la línea MA-10 la activación del RLH provoca la inducción de MKP-1. Este efecto resulta tanto de la activación de la transcripción génica como de la estabilización de la proteína (*Brion y col., 2011*). La activación transcripcional es dependiente de PKA mientras que la estabilización ocurre como consecuencia de la fosforilación mediada por ERK en los sitios S359 y S364 (*Brion y col., 2011*).

Más recientemente, se demostró que la activación del RLH también produce la inducción de MKP-2, otra MKP de localización nuclear. La inducción ocurre por un mecanismo dependiente de PKA, que lleva a la activación de la transcripción del gen correspondiente y a la estabilización de la proteína (*Gómez y col., 2013*). La cinética de inducción de MKP-2 es diferente a la de MKP-1. Luego de 15 minutos de estimulación del RLH, los niveles de ARNm de MKP-1 son significativamente más altos que las células no estimuladas; mientras que para detectar un aumento significativo sobre los niveles del ARNm de MKP-2 se requiere un tiempo de estimulación más prolongado (1 hora aproximadamente) (*Gómez y col., 2013*).

- El papel funcional de la inducción de MKP-1 y 2 en la acción de LH

Luego de demostrar que tanto LH/hCG como ACTH y Angiotensina provocan la inducción de MKP-1, surgió la pregunta acerca del rol funcional de este evento regulatorio. Nuestro grupo de trabajo se abocó a este objetivo y se focalizó en el hecho que la inducción de la proteína StAR es dependiente de ERK1/2 (*Gyles y col., 2001*). Por lo tanto, teniendo en cuenta que MKP-1 es una enzima de localización nuclear, se propuso que la inducción de MKP-1, por su acción sobre ERK1/2, podría promover su desfosforilación y de este modo atenuar la activación del promotor STARD1, llevando así al cierre de la inducción de StAR. Se analizó esta posibilidad y se demostró que la sobreexpresión de MKP-1 reduce el efecto del AMPc sobre el promotor de STARD1, sobre los niveles del ARNm de StAR y sobre la producción de esteroides. Más aún, el bloqueo de la expresión de MKP-1 (mediante un ARN de interferencia) produce efectos opuestos, lo que demuestra claramente que la inducción de MKP-1 contribuye al cierre de la acción hormonal sobre la estimulación aguda de la eseroidogénesis (*Brion y col., 2011*).

En cuanto al mecanismo por el cual la inducción de MKP-1 contribuye a disminuir la velocidad de síntesis de esteroides se plantean dos hipótesis. Una de ellas plantea una acción de MKP-1 sobre la fosforilación de SF1. Dado que SF1 se activa vía ERK1/2, este factor es un posible candidato que conecta la inducción de MKP-1 con el descenso en la velocidad de síntesis de StAR y de esteroides. La otra hipótesis se relaciona con NUR77. La inducción de NUR77 puede ser regulada por ERK1/2 y por ende, puede ser susceptible de modulación por MKP-1. En células de Leydig la estimulación del RLH lleva a la inducción de NUR77, evento previo a la inducción de StAR. En otros sistemas se ha demostrado que la inducción de NUR77 es dependiente de ERK1/2. Por lo tanto, la inducción de MKP-1, por su acción sobre ERK1/2, podría contribuir a concluir la acción hormonal sobre la expresión de NUR77 y

por ende, sobre StAR. Sin embargo las dos hipótesis mencionadas plantean mecanismos no excluyentes, más aún no podemos descartar la existencia de otros mecanismos.

En células MA-10, los niveles de la proteína MKP-2 se elevan mas tardíamente que los de MKP-1 en respuesta a hCG u 8Br-AMPc (*Brion y col., 2011; Gómez y col., 2013*). En consecuencia, ambas enzimas promueven la desforilación de ERK1/2 en un marco temporal diferente. Así, la desfosforilación de ERK1/2 que se observa entre los 15 y 60 min de estimulación ocurre como consecuencia de la inducción de MKP-1, mientras que la desfosforilación en la fase terminal de actividad de ERK1/2, particularmente entre los 120 y 180 min, ocurre por la inducción de MKP-2. Dado que la inducción de MKP-2 ocurre más tarde que la inducción de StAR, es poco probable que MKP-2 pueda modularla. La expresión del gen CYP11A1, que codifica para la enzima P450scc, se induce por LH/hCG mediante un mecanismo dependiente de ERK1/2 (*Yamashita y col., 2011*) y con una cinética más lenta que la que exhibe STARD1 (*Lavoie y King, 2009*). Sobre la base de esos antecedentes, nuestro grupo de trabajo ha analizado el modo en que la expresión de MKP-2 modifica la expresión del gen CYP11A1. Demostramos que la inducción por hCG/AMPc del gen CYP11A1 es dependiente de ERK1/2 y en línea con esta característica, el bloqueo de la expresión de MKP-2 lleva al cierre de la acción hormonal sobre la actividad del correspondiente promotor y sobre los niveles del ARN (*Gómez y col., 2013*).

Hipótesis y objetivos

En células de Leydig MA-10 la estimulación del RLH con hCG provoca, vía AMPc/PKA, la activación de ERK1/2. La actividad de estas quinasas es necesaria en las acciones estimulatorias de la hormona sobre la síntesis de esteroides y sobre la proliferación de las células de Leydig. La activación de ERK1/2 por LH/hCG se corresponde con la estricta regulación que ejerce la hormona sobre la expresión de dos enzimas que controlan la actividad de MAPK en el núcleo: MKP-1 y MKP-2. A diferencia de estas enzimas, que se inducen por diferentes tipos de estímulos y desfosforilan a los miembros de las tres subfamilias de MAPKs, la isoforma MKP-3 se induce sólo por estímulos proliferativos y es específica para ERK1/2. Aún cuando se conoce que LH tiene efectos sobre la proliferación de la célula de Leydig, aún no se ha descripto si la expresión de MKP-3 es regulada por LH en ese tipo celular.

Previamente demostramos que la estimulación de las células MA-10 con AMPc promueve la estabilización de MKP-1 por fosforilación en los sitios S359 y S364. Sin embargo MKP-1 presenta otros dos sitios de fosforilación por ERK1/2 que también podrían ser fosforilados ante la estimulación del RLH: S296 y S323. Sin embargo se desconoce si la estimulación del RLH impacta sobre estos sitios y el efecto que la fosforilación en los mismos puede tener sobre las características de la proteína, por ejemplo, sobre la estabilidad. La tasa de síntesis de esteroides es dependiente de la proteína StAR, cuya inducción requiere de la actividad de ERK y por lo tanto, es modulada por los niveles de MKP-1. El incremento de los niveles de la proteína StAR ocurre como consecuencia de la expresión del gen STARD1, cuyo promotor se activa por diversos factores de transcripción, algunos, como SF1, de actividad dependiente de ERK1/2. NUR77 también participa en la inducción de STARD1 y, en otros sistemas se ha demostrado que su expresión depende de la actividad de ERK.

Sobre la base de lo sintetizado, planteamos las siguientes hipótesis:

- ✓ La activación del RLH regularía la expresión de MKP-3 como mecanismo para controlar la actividad de ERK1/2 en el citoplasma.
- ✓ La acción de LH/hCG sobre MKP-3 podría impactar sobre algún aspecto relacionado con la acción proliferativa de LH.
- ✓ LH/hCG regularía la inducción de MKP-1 por fosforilación por ERK1/2 en sitios adicionales a los ya descriptos. En particular, la fosforilación podría ocurrir en los sitios S296 y S323. La fosforilación en estos aminoácidos podría alterar la estabilidad de MKP-1.
- ✓ La inducción de NUR77 por activación del RLH podría requerir la actividad de ERK1/2.

- ✓ Si la fosforilación de MKP-1 altera su estabilidad, entonces modularía la expresión de NUR77 en el caso en que la expresión de este factor sea dependiente de ERK1/2.

OBJETIVOS

En células de Leydig de la línea MA-10 se analizarán los siguientes objetivos:

Con respecto a MKP-3:

1. Determinar si hCG y AMPc controlan la expresión de MKP-3

1.1. Analizar el efecto de la hormona y de un derivado del AMPc sobre los niveles de ARNm y determinar si la estimulación modifica la expresión génica y/o la vida media del ARNm.

1.2. Determinar el rol de las quinasas PKA y ERK1/2 en la acción de la hormona sobre los niveles del ARNm de MKP-3.

1.3. Analizar si la regulación de la expresión de MKP-3 por mecanismos post-traduccionales.

2. Determinar el papel funcional de MKP-3 en células de Leydig

2.1. Mediante el bloqueo de la expresión de MKP-3 por un ARN de interferencia específico, evaluar el efecto de esta fosfatasa sobre los niveles de P-ERK.

2.2. Evaluar si la estimulación del RLH provoca cambios en la expresión del inhibidor de la proliferación celular p21. Analizar si MKP-3 altera los niveles de p21 mediante el bloqueo de su expresión.

Con respecto a MKP-1:

3. Analizar si la inducción de NUR77 por incremento de AMPc ocurre por un mecanismo dependiente de ERK1/2

3.1. Estudiar los efectos del AMPc sobre los niveles del ARNm de NUR77 y en que medida estos parámetros se alteran por inhibición de ERK1/2

4. Determinar si el AMPc regula la expresión de MKP-1 por fosforilación en S296 y S323 y en qué medida la variación en la expresión de MKP-1 altera la expresión de NUR77

4.1 Determinar la vida media de la proteína recombinante flag-MKP-1 y de las correspondientes formas mutadas

4.2 Analizar si las mutaciones en los sitios de fosforilación por ERK1/2 son relevantes en la acción hormonal sobre la inducción de NUR77.

Materiales y Métodos

I. 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), PD98059, actinomicina D (actD), seroalbúmina bovina (BSA), oligonucleótidos random, estándares de peso molecular para electroforesis, HEPES, ditiotreitol, 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) y Temed.

Los siguientes reactivos de biología molecular fueron provistos por Promega (Madison, WI, USA): las enzimas de restricción, la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), la enzimas Go Taq ADN polimerasa y Pfx Platinum ADN polimerasa, dNTPs y el inhibidor de ribonucleasas RNAsin®. 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).

La Tripsina-EDTA y antibióticos fueron adquiridos en la empresa Gibco-Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA). El material de plástico para cultivo se compró a Corning-Costar (NY, USA).

Los anticuerpos utilizados fueron del siguiente origen: el anticuerpo anti-MKP-3 fue comprado a Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, USA); el anticuerpo contra las formas fosforiladas y no fosforiladas de ERK1/2 fueron comprados a Cell Signaling (Beverly, MA, USA); el anticuerpo monoclonal anti-β-tubulina fue comprado a Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA); los anticuerpos anti-IgG de ratón y de conejo desarrollados en cabra y conjugados con peroxidasa fueron de BioRad Laboratories (Hércules, California, USA).

Los siguientes productos fueron de la compañía BioRad Laboratories: membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), acrilamida, bisacrilamida y equipos de electroforesis (Mini-Protean II, equipos de transferencia y de secado de geles). Se utilizó un equipo de electroforesis para geles de agarosa Gel XL ultra V-2 de la marca Labnet International (Edison, NJ, USA). El reactivo de detección de Western blot por quimioluminiscencia (ECL) fue provisto por GE Argentina (Buenos Aires, Argentina).

II. LÍNEA CELULAR

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio células de Leydig de la línea MA-10, una línea celular de origen murino originada a partir de un tumor trasplantable de células de Leydig, M5480P (*Ascoli M., 1981*). Las células MA-10, generosamente cedidas por Mario Ascoli, University of Iowa, College of Medicine (Iowa City, IA, USA), fueron mantenidas en medio Waymouth MB752/1 conteniendo $NaHCO_3$ 1,1 g/l, Hepes 20 mM, gentamicina 50 mg/ml, y suero equino 15% inactivado por calor. Estas células retienen la capacidad de unir LH/hCG, conservan los mismos pasos regulatorios que las células de Leydig, y producen progesterona (P4) como esteroide principal, en lugar de testosterona.

III. TRATAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS

III. 1. Estimulación de las células

Las células MA-10 fueron sembradas en una densidad de aproximadamente 5 x 10^4, 1 x 10^5 ó 4 x 10^5 células/pocillo de placas de cultivo de 48, 24 ó 6 pocillos respectivamente y crecidas en estufa a 36°C, gaseada con 5% de CO_2. Luego de alcanzar el grado de confluencia apropiado, las células fueron arrestadas en la fase G1 del ciclo celular transfiriéndolas en la fase logarítmica del crecimiento a medio sin suero durante 24 horas.

La estimulación de las mismas se realizó por incubación en medio libre de suero en presencia o ausencia de la hormona trófica hCG u 8Br-AMPc, en concentraciones submáximas, según lo indicado en cada experimento. El tiempo de estimulación y concentración del estímulo utilizados se indica en la descripción de cada experimento en particular. Los compuestos PD98059 y ActD se agregaron al medio de cultivo 30 minutos previos al estímulo hormonal.

Al finalizar los tratamientos, la monocapa de células se lavó con solución salina NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,47 mM (PBS pH 7,4) para ser luego procesadas según se indica en cada caso.

III. 2. Obtención de los lisados celulares

Luego de los diferentes tratamientos realizados las células fueron lisadas. La lisis fue realizada con una solución conteniendo Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 125 mM y Tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasas

(leupeptina 10 mM, pepstatina A 1 mM, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 200 mM, NaF 50 mM y β-glicerol fosfato 40 mM). Las células fueron cosechadas mecánicamente y de la suspensión obtenida se realizó la cuantificación de proteínas, que luego fueron analizadas por Western blot.

IV. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

IV.1. Determinación de proteínas por el método de Bradford

La concentración de proteínas en las muestras fue determinada siguiendo el método descripto por Bradford (*Bradford MM., 1976*). La curva estándar correspondiente se realizó con seroalbúmina bovina.

IV.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas provenientes de lisados celulares fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE). Se realizaron geles planos de poliacrilamida entre placas de vidrio, utilizando el sistema MiniProtean III System de BioRad. El gel separador se preparó con acrilamida 10%, 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, SDS2%, 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.

IV.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/cm^2 durante 90 minutos.

Las membranas fueron luego incubadas en solución salina-Tris (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, TBS) conteniendo Tween 20 0,5% (TTBS) con leche en polvo libre de grasas al 5% o BSA al 1% (solución de bloqueo) durante 60 minutos a temperatura ambiente para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos. Luego, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4ºC con las diluciones apropiadas del anticuerpo primario a analizar: anti-MKP-3 1/100, anti-P-ERK 1/5000, anti-ERK1/2 1/20000, anti β-tubulina 1/5000).

Posteriormente las membranas fueron lavadas 4 veces por 10 minutos en TTBS. Luego, fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo conjugado con peroxidasa en una dilución adecuada (1/3.000-1/20.000). Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y un último lavado con TBS. Finalmente la señal fue detectada por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL y autorradiografía.

IV.4. Inmunocitoquímica

Las células fueron crecidas en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, luego fueron lavadas una vez con PBS y fijadas 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 dirigido contra la proteína MKP-3 (anti-MKP-3) en cámara húmeda a 4ºC durante 24 horas. La detección de los anticuerpos específicos se realizó con un anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado con el fluoróforo cy3 para la detección del anticuerpo (Molecular Probes, Eugene, OR). Los núcleos fueron teñidos con 4 ',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Luego de los lavados correspondientes con PBS, los cubreobjetos fueron montados con reactivo FluorSave (Calbiochem, CA, USA). Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio de epifluorescencia modelo Olympus BX50 acoplado a una cámara digital Cool/Snap Proof Color PM-c35 (Dpto. de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Image J. Se calculó la intensidad de fluorescencia de cada célula, la cual se normalizó contra el área correspondiente.

V. ANÁLISIS DE ARN Y ADN

V.1. Extracción de ARN total

El ARN total se aisló con el reactivo *Tri Reagent* (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati), siguiendo la técnica recomendada por el fabricante. Las células de la monocapa se lisaron por agregado de 1,2 ml de *Tri Reagent* por pocillo de 6 cm de diámetro y disrupción mecánica con pipeta automática. Los lisados se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para producir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Al término de esta incubación se agregó a los lisados un volumen de cloroformo (0,24 ml/ml de *Tri Reagent*) y los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 segundos. A continuación se incubaron las muestras durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4 ºC. Se aisló la fase acuosa (capa superior), se le agregó alcohol isopropílico (0,5 ml/ml de *Tri Reagent*) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12000 x g a 4 ºC para precipitar el ARN. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el precipitado, ARN, se lavó con etanol 75% (1 ml/ml de *Tri Reagent*). Luego de centrifugar a 7500 x g durante 5 minutos a 4 ºC se retiró el sobrenadante y el ARN precipitado se secó al aire durante a 10 minutos. Se agregó al precipitado 15 µl de agua libre de ARNasas y se incubó durante 10 minutos a 60ºC para disolver completamente el ARN.

V.2. Reacción de transcripción reversa

Para la transcripción reversa (*Reverse Transcription*, RT) se utilizó la transcriptasa reversa derivada del virus de la leucemia murina de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, MMLV RT), que es una ADN polimerasa dependiente de ARN que puede utilizarse para sintetizar ADNc a partir de templados de ARNm largos (>5 kb).

Para realizar la RT de los ARNm se utilizaron 2 µg de ARN total y 1 mg de oligonucleótidos al azar (random), llevando a un volumen de 15 µl con H_2O tratada con DEPC. La mezcla fue incubada 5 minutos a 70ºC para desarmar las estructuras secundarias del ARN, y luego fue colocada rápidamente a 4ºC durante 5 minutos. A esta preparación se le adicionaron 10 µl de una mezcla de reacción la cual contenía 200 unidades de la enzima MMLV RT, 1,25 mM de cada dNTP, 25 unidades del inhibidor de ARNasas RNAsin® (1 U/ µl) en la solución de reacción de la enzima (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl2 3 mM y DTT 10 mM). Las muestras se

incubaron durante 1 hora a 37ºC y al término de la reacción se tomaron alícuotas de 1-2 µl a fin de amplificar el ADNc obtenido utilizando oligonucleótidos específicos.

V.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El ADNc obtenido a partir de los ARNm que codifican para la proteína MKP-3 (NM_026268.3), p21 (AF035683.1), NUR77 (NM_010444) y para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (NM_002046.3) fueron amplificados llevando a cabo la reacción en cadena de la polimerasas (*polimerase chain reaction*, PCR) en tiempo real utilizando el reactivo *SYBR Green Master Mix Reagent* (*Applied Biosystem*) y un equipo ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System* (*Applied Biosystem*). Los oligonucleótidos (5´-3´) directos y reversos utilizados se muestran en la tabla 1. Cada oligonucleótido se utilizó en una concentración de 0,3 µM. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Para MKP-3 y GAPDH: a) 10 minutos a 95ºC, b) 15 segundos a 95ºC, c) 60 segundos 60ºC, con una repetición de 40 ciclos del segundo y tercer paso; para p21: a) 10 minutos a 95ºC, b) 15 segundos a 95ºC, c) 60 segundos 64ºC, con una repetición de 40 ciclos del segundo y tercer paso y para NUR77: a) 10 minutos a 95ºC, b) 15 segundos a 95ºC, c) 60 segundos 62,5ºC, con una repetición de 40 ciclos del segundo y tercer paso.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa *Sequence Detection Software* (*Applied Biosystem*, *Version* 1.3). Se realizó la cuantificación de la expresión génica a partir de curvas estándar y cada muestra se normalizó con la expresión de GAPDH en cada caso. La eficiencia de amplificación (E) para cada par de oligonucleótidos se calculó a partir de la pendiente de una curva de amplificación estándar en la cual se representó el valor Ct (*cycle threshold,* umbral de ciclos) versus log (ng ADNc) por reacción. La eficiencia E = 10 – (1/pendiente) se consideró óptima cuando E= 2 ± 0,1.

Oligonucleótido	Secuencia 5´ -3´
MKP-3 directo	ATAGATACGCTCAGACCCGTG
MKP-3 reverso	ATCAGCAGAAGCCGTTCGTT
p21 directo	TTGGAGTCAGGCGCAGATCCACA
p21 reverso	CGCCATGAGCGCATCGCAATC
NUR77 directo	AGCTTGGGTGTTGATGTTCC
NUR77 reverso	AATGCGATTCTGCAGCTCTT
GAPDH directo	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH reverso	GCATGGACTGTGGTCATGAG

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR en tiempo real.

VI. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Para purificar los productos de amplificación por PCR y los fragmentos obtenidos mediante el 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, que se describe a continuación.

Cada fragmento del gel se colocó en un tubo de 1,5 ml de capacidad y se adicionaron 10 µl de solución de unión a la membrana (isotiocianato de guanidina 4,5 M, acetato de potasio pH 5 0,5 M) por cada 10 mg de gel de agarosa. El sistema se incubó 10 minutos a 55-65°C en agitación. Se transfirió la mezcla de gel disuelto a una minicolumna Wizard® conteniendo una membrana de sílica, se incubó 1 minuto y luego se centrifugó durante 1 minuto a 16.000 xg. Con este procedimiento se separa el ADN, que queda adherido a la sílica, y el eluato que se descarta. Se lavó la columna con 700 ml de solución de lavado de la membrana (acetato de potasio pH 5,0 10 mM; EDTA,7 µM, pH 8, etanol 80%) y se repitió el centrifugado. Se realizó un segundo lavado con 500 ml de solución, centrifugando esta vez durante 5 minutos. Se descartó el eluato y se centrifugó 1 minuto adicional. Finalmente se eluye el ADN con 50 ml de H_2O libre de nucleasas, mediante la centrifugación durante 1 minuto a 16000 xg.

VI.1. Electroforesis en geles de agarosa

Para el análisis de muestras de ADN se utilizaron geles de agarosa de distintos porcentajes (por lo general entre 1-1,5% p/v) conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y preparados en solución TAE (4,84 g Tris, 1,14 ml ácido acético glacial, 0,74 g $Na_2EDTA.2H_2O$ en agua deionizada en cantidad suficiente para 1 litro de solución). 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*).

VII. MÉTODOS GENERALES DE OBTENCIÓN DE VECTORES

VII.1. Plásmidos utilizados

El plásmido pFLAG-ERK2, fue gentilmente cedido por Melanie Cobb, *Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA* (*Robinson y col., 2002*). El plásmido pGL3-NUR77 fue gentilmente cedido por Takashi Yazawa, Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui, Japan, (*Inaoka y col., 2008*)

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

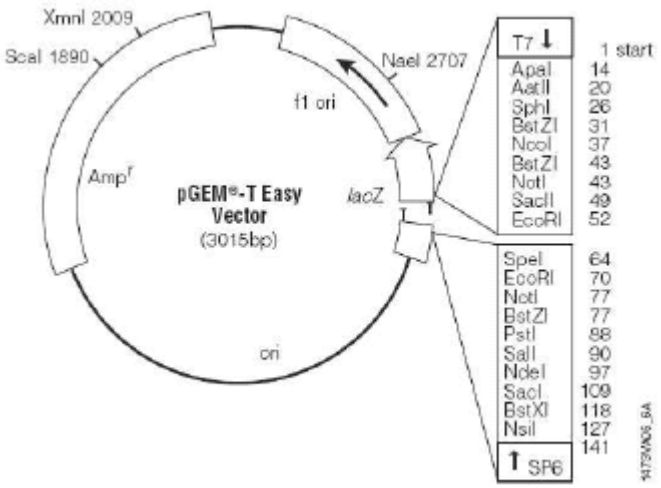


Figura 8: Mapa del plásmido comercial pGEM®-T Easy.

El plásmido p3XFLAG-CMV-10 (Sigma) (Figura 9), se utiliza para estudios de sobreexpresión de proteínas fusionadas a una secuencia específica de aminoácidos (flag) que permite su identificación mediante un anticuerpo comercial anti-flag.

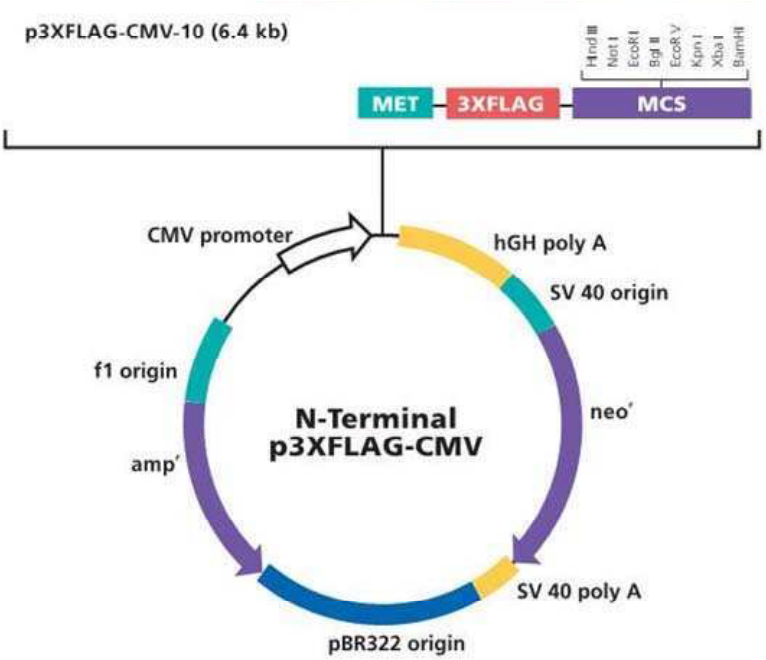


Figura 9: Mapa del plásmido comercial p3XFLAG-CMV-10.

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

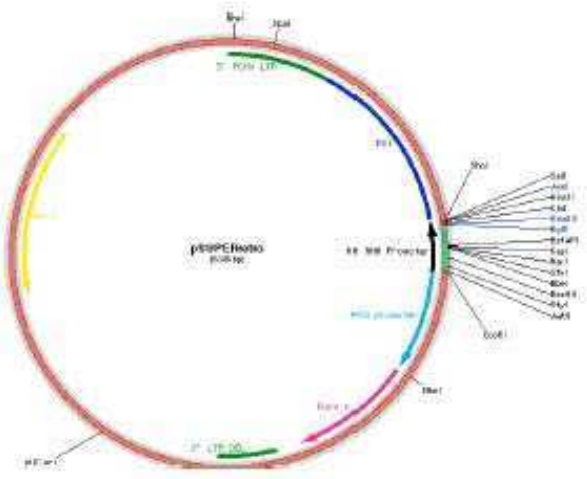


Figura 10 : Mapa del plásmido comercial pSUPER.retro

VII.2. Ligación en el plásmido pGEM®-T Easy

Los fragmentos de ADN purificados por gel se ligaron al plásmido pGEM®-T Easy para su posterior secuenciación y análisis. Se colocó 1 ml de solución amortiguadora 10x para ADN ligasa de T4 (Tris-HCl 300 mM, pH 7,8, $MgCl_2$ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM, polietilenglicol 10%), 1 ml (50 ng) del vector, la cantidad correspondiente del fragmento de ADN a ligar en relación 3:1 (inserto: vector) y 1 ml de ADN ligasa de T4 (3U) y H_2O en un volumen final de 10 ml. Se dejó transcurrir la reacción durante toda la noche a 4ºC. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes XL1-Blue.

VII.3. Obtención del plásmido de expresión pFLAG-MKP-3

Se partió del plásmido pGEM®-T Easy conteniendo la secuencia de 1,18 kb de MKP-3 proveniente de la reacción de PCR. Se digirió 1 mg de plásmido y del vector p3XFLAG-CMV-10 con las enzimas *NotI* y *EcoRI*. El clonado del fragmento se realiza en el mismo marco de lectura que la secuencia de aminoácidos (flag) que está ubicado en el extremo 5´ del vector para generar una proteína de fusión flag-MKP-3 con el flag en el extremo N-terminal de la misma. La proteína recombinante puede ser detectada por Western blot con un anticuerpo anti-flag. El protocolo de ligación, transformación de bacterias y purificación del plásmido fue similar al detallado anteriormente. La construcción obtenida fue verificada por digestión con enzimas de restricción y mediante secuenciación.

Oligonucleótido	Secuencia 5´ -3´
MKP-3 directo	TTGCGGCCGCTATGATAGATACGCTCAGA
MKP-3 reverso	ACGCGAATGAAGGAATGGGGACAACTC

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para amplificar ADNc de MKP-3 y clonarla posteriormente en el plásmido pFLAG

VII.4. Obtención de un vector de expresión de un ARN de interferencia específico para MKP-3

Con el fin de completar la caracterización de la expresión de MKP-3 y analizar el papel funcional de esta proteína procedimos a anular la expresión de la misma y a evaluar los efectos de este procedimiento. La estrategia utilizada para disminuir específicamente los niveles de la proteína MKP-3 consistió en transfectar las células con una construcción obtenida a partir del vector pSUPER.retro (OligoEngine), el cual dirige la síntesis intracelular de ARNs pequeños llamado shARN (*short hairpin*) bajo el control del promotor de la ARN H1 polimerasa III. El plásmido recombinante se obtiene mediante la inserción de una secuencia que es específica del gen cuya expresión se desea reducir.

Con el fin de crear un ARN de interferencia contra MKP-3, se diseñaron oligonucleótidos de 19 pb cuya secuencia es idéntica a una región específica del ARNm de MKP-3 (Tabla 3). Cada oligonucleótido presenta las siguientes características: un sitio de corte para una enzima de restricción (*BglII* o *HindIII*), una secuencia en orientación sentido (correspondiente a una región del ARNm cuya expresión se quiere inhibir), una región de 9 nucleótidos ubicada en el centro y una secuencia en orientación antisentido complementaria a la secuencia sentido. La secuencia de 9 nucleótidos es una secuencia establecida y es la porción que genera el bucle o *hairpin*. El vector pSUPER.retro se cortó con las enzimas ya mencionadas y el vector linealizado se purificó a partir de un gel de agarosa. El par de oligonucleótidos específico (sentido y antisentido) se hibrida y luego se clona en los sitios de restricción de las enzimas *BglII* y *HindIII* del vector pSUPER.retro bajo el control del promotor de la ARN polimerasa III. Se genera así la construcción pSUPER.retro-MKP-3 (shARN MKP-3).

Oligonucleótido	Secuencia 5´ -3´
MKP-3 shRNA directo	GATCCCCACGACATTGTTAAGATGAATTCAAGAGATTCATCTTAACAATGTCGTTTTTTA
MKP-3 shRNA reverso	AGCTTAAAAAACGACATTGTTAAGATGAATCTCTTGAATTCATCTTAACAATGTCGTGGG

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para generar shARNs específicos de MKP-3 de ratón.

El transcripto resultante del vector predice una forma de replegado sobre sí mismo con una estructura de bucle. El bucle del transcripto precursor es rápidamente clivado en la célula produciendo de esta manera el shRNA funcional. La transfección de las células con esta construcción lleva a la degradación específica del ARNm de MKP-3. La construcción obtenida fue verificada por digestión con enzimas de restricción y mediante secuenciación.

VII.5. Mutación sitio-dirigida

Con el fin de obtener las construcciones pFLAG-MKP-1-S359A-S364A y pFLAG-MKP-1-S296A-S323A se realizó una reacción de mutación sitio dirigida utilizando el *Stratagene QuickChange TM Site-Directed Mutagenesis Kit*.

Para generar la mutante pFLAG-MKP-1-S359A-S364A se realizó la replicación del plásmido pFLAG-MKP-1 utilizando la polimerasa *Pfu Ultra* de alta fidelidad, a partir de un par de oligonucleótidos mutagénicos especialmente diseñados (Tabla 4). Debido a la cercanía de los sitios a mutar, este par de oligonucleótidos presenta los dos cambios de bases necesarios en los codones de la secuencia de MKP-1 de manera de cambiar las Serinas 359 y 364 por Alaninas.

Para generar la mutante pFLAG-MKP-1-S296A-S323A se realizaron dos mutaciones en forma secuencial. En primer lugar se obtuvo el vector pFLAG-MKP-1-S296A, utilizando los oligonucléotidos específicos para generar la mutación de la Serina 296 por una Alanina. Luego, se realizó la replicación de ese vector con los oligonucleótidos específicos para realizar la mutación de la Serina 323 por una Alanina; obteniendo así la forma doblemente mutada.

Oligonucleótido	Secuencia 5´ -3´
MKP-1-S359A-S364A directo	CTACCTTAAA**GC**CCCCATCACCACC**G**CTCCAAGCTG
MKP-1-S359A-S364A reverso	CAGCTTGGAG**C**GGTGGTGATGGGG**GC**TTTAAGGTAG
MKP-1-S296A directo	GAGGCGGAGTATCATC**G**CCCCGAACTTCAGC
MKP-1-S296A reverso	GCTGAAGTTCGGGG**C**GATGATACTCCGCCTC
MKP-1-S323A directo	CTCTGCTGAAGCTGGG**GC**CCCTGCCATGGCTGTC
MKP-1-S323A reverso	GACAGCCATGGCAGGG**GC**CCCAGCTTCAGCAGAG

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para generar las formas mutadas de MKP-1.

VIII. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO DE BACTERIAS

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

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

VIII.1. Preparación de bacterias competentes

Para la preparación de bacterias competentes, se inoculó una colonia aislada de la cepa XL1-Blue en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación continua durante toda la noche. A continuación, se hizo una dilución 1:100 sembrando alícuotas de 100 ml de bacterias en 10 ml de medio LB fresco y se incubó en agitador nuevamente a 37°C hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial (DO_{600nm} = 0,4-0,6). Luego el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos y el sedimento resuspendido en 5 ml de $CaCl_2$ 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 $CaCl_2$ 50 mM e incubado durante toda la noche a 4°C con el agregado de glicerol (25%). A

continuación las células fueron fraccionadas en alícuotas de 200 ml y se conservaron a -70°C.

VIII.2. Transformación de *Escherichia coli* competentes

Todos los materiales para el procedimiento de transformación, incluyendo las soluciones y los tubos de polipropileno, fueron mantenidos a 4ºC durante todo el procedimiento. Las bacterias competentes fueron descongeladas en un baño de hielo/H_2O. En un tubo Eppendorf frío se colocaron 10 ml de la solución de ADN plasmídico (0,1 mg) y se adicionaron 200 ml de la suspensión de células competentes mezclando con pipeta para homogeneizar la mezcla. Se dejó estabilizar a 4ºC durante 30 minutos y luego se realizó un choque térmico a 42ºC por 45 segundos, seguido inmediatamente por una incubación en hielo durante otros 2-3 minutos. Posteriormente se adicionaron 500 ml de medio LB fresco (sin antibióticos) y se incubaron a 37ºC durante 60 minutos con agitación, para lograr la recuperación de las células. Finalmente se centrifugaron a temperatura ambiente a 10000 rpm durante 3 minutos y se cultivaron las bacterias en placas conteniendo LB agar con ampicilina. Las placas fueron incubadas en estufa toda la noche a 37ºC.

IX. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

IX.1. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico a pequeña escala

Para el aislamiento y purificación del ADN plasmídico en pequeña escala (MINIPREP) se utilizó el sistema Wizard® (Promega) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante que se describe a continuación.

Para la obtención de las bacterias, 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/ml. A continuación se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 200 µl de solución de neutralización (acetato de potasio 1,32M, pH 4,8) y la suspensión obtenida se centrifugó a 10000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se trasvasó a una columna conteniendo la resina DNA Wizard® (Promega) y luego se centrifugó la columna a 10000 xg durante 2 minutos. El ADN plasmídico quedó retenido en la columna y la matriz se lavó con 2 ml de una solución conteniendo Tris-

HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM y etanol 55%. Luego se volvió a centrifugar a 10000 xg durante 2 minutos. Por último el ADN se eluyó de la resina con 50 µl de agua libre de nucleasas precalentada a 60°C. Se centrifugó por última vez la columna a 10000 xg durante 2 minutos y se recogió el eluato.

IX.2. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico a mediana escala

Para la purificación del ADN plasmídico a mediana escala (MIDIPREP) se utilizó el sistema Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) y se procedió como se describe a continuación, de acuerdo a las instrucciones del 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 xg 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 mg/ml. A continuación se agregaron 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) y se incubó el sistema a temperatura ambiente durante 10 minutos. La suspensión resultante se centrifugó a 14000 xg durante 15 minutos y el sobrenadante se trasvasó a un tubo conteniendo la resina DNA Wizard®. La mezcla ADN/resina se trasvasó a una columna conectada a una bomba de vacío. Luego de aplicar el vacío, el ADN plasmídico quedó retenido en la columna. 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 mM y etanol 55%. Luego de secar la resina durante 30 segundos, se cortó la columna y la parte inferior de ésta se transfirió a un tubo Eppendorf. El sistema se centrifugó a 10000 xg durante 2 minutos. Finalmente el ADN se eluyó de la resina con 300 µl de H_2O libre de nucleasas precalentada a 60°C por centrifugación a 10000 xg durante 20 segundos.

X. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las células fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia en placas de 24 pocillos. Al día siguiente se realizó la transfección. La transfección fue realizada con 0,8 µg de plásmido en medio Opti-MEM y 2 ml de reactivo Lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en 500 µl de medio sin antibióticos. Los plásmidos utilizados fueron p3xFLAG-MKP-3, shRNA-MKP-3, p3xFLAG-MKP-1 o los vectores vacíos como control. Para los experimentos de análisis de la actividad de

promotores, las células fueron cultivadas en placas de 48 pocillos y transfectadas con 0,05 µg del plásmido pGL3 conteniendo el ADNc de la luciferasa de luciérnaga (*Firefly luciferase*) bajo el control del promotor de NUR77 (pGL3-NUR77) (*Inaoka y col., 2008*), junto con 0,35 µg del plásmido conteniendo el ADNc de MKP-1 y con 5 ng del plásmido pRL (*Renilla luciferase*).

Luego de 6 horas post-transfección, se cambió el medio de cultivo por medio fresco. Al día siguiente las células fueron privadas de suero durante 24 horas. Luego se realizaron las estimulaciones correspondientes y las células fueron procesadas para la obtención del ARN, las proteínas o la medición de la actividad del promotor. 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 (*Enhanced Green Fluorescent Protein,* EGFP).

XI. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA

El análisis de la actividad del promotor del gen en estudio se evaluó a partir de la actividad de la enzima luciferasa de luciérnaga (*Firefly luciferase*), cuya expresión está bajo el control de este promotor. Las células fueron transfectadas como se comentó previamente. Luego de la transfección, las células fueron estimuladas durante los tiempos correspondientes. Luego del tratamiento, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 70 µl de una solución de lisis (*Passive Lysis Buffer 1x*, Promega) durante 15 minutos con agitación a temperatura ambiente. Una alícuota de 5-10 µl del lisado fue utilizada para determinar la actividad de luciferasa con el *kit Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega). Mediante este *kit* se determina la actividad de ambas luciferasas y se normaliza la actividad de la luciferasa de luciérnaga respecto de la actividad constitutiva de la luciferasa de *Renilla* y se expresa en unidades relativas. La detección de la actividad de ambas enzimas se realizó mediante un lector multiplaca SynergyTM HT (Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments).

XII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como la media ± el error estándar de la media (ES). La significancia estadística fue evaluada utilizando ANOVA, seguida del test de Tukey. Se consideró significativa $P < 0,05$.

Resultados

I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MKP-3 POR hCG EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10.

I.1. Regulación de los niveles del ARNm de MKP-3

Se ha mencionado en la introducción de este trabajo de tesis que ciertos estímulos provocan un incremento en los niveles del ARNm correspondiente a MKP-3. Incluso se ha demostrado que este efecto es mediado, en parte, por estabilización del ARNm (*Bermudez y col., 2011*). En este trabajo analizamos si LH es capaz de modular los niveles del ARNm de MKP-3. Para ello se utilizó como estrategia la estimulación del receptor del LH (RLH) con la hormona gonadotrofina coriónica de origen humano (hCG). Se analizó el efecto tanto de hCG como el de un análogo permeable de su segundo mensajero, 8Br-AMPc, sobre la expresión génica y sobre la estabilidad del mensajero.

I.1.1. Efecto de hCG y AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-3

Con el fin de evaluar la regulación transcripcional de MKP-3 por acción hormonal, los cultivos de células de la línea MA-10 fueron privados de suero durante 24 horas y luego fueron incubados en presencia o ausencia de la hormona hCG (10ng/ml) o de 8Br-AMPc (0,5 mM) durante distintos tiempos. A continuación se purificó el ARN total de las células, se realizó la transcripción reversa y se evaluó el nivel de ARNm de MKP-3 mediante PCR en tiempo real, utilizando oligonucleótidos específicos. Como control de la cantidad de ARN utilizado en cada reacción, se realizó en paralelo la amplificación del transcripto correspondiente a la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), cuyos niveles no se modifican por el tratamiento hormonal (*housekeeping gene*).

Los resultados mostraron que, en células de Leydig MA-10, la hormona hCG promueve la inducción de MKP-3 (Figura 11). La cinética de inducción de MKP-3 mostró un incremento significativo de los niveles del ARNm a partir de las 2 horas de estimulación (aproximadamente 3,5 veces respecto al control). Luego de 6 horas, los niveles del ARNm disminuyen a los valores basales. Resultados similares se observaron cuando las células fueron estimuladas con 8Br-AMPc. En este caso, el máximo de estimulación se alcanzó luego de 2 horas (aproximadamente 3,5 veces respecto al control).

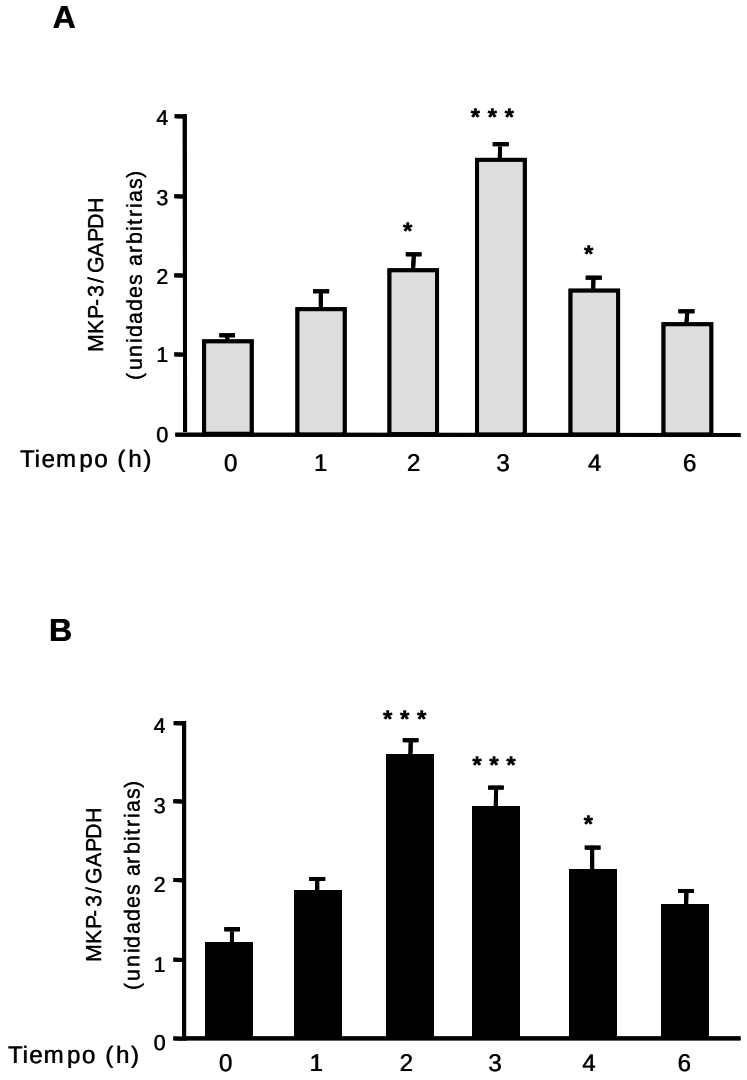


Figura 11. Efecto de hCG y 8Br-AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-3 en células de Leydig MA-10. Células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 h, luego fueron tratadas con hCG 10 ng/ml **(A)** u 8BR-AMPc 0,5 mM **(B)** durante los tiempos indicados. Los niveles de ARNm correspondientes a MKP-3 y GAPDH (control) se analizaron por PCR en tiempo real. El gráfico muestra la relación MKP-3/GAPDH en unidades arbitrarias. Los valores representan la media ± ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ vs. tiempo 0.

I.1.2. Efecto del bloqueo de la transcripción sobre el aumento del ARNm de MKP-3 promovido por AMPc

Los resultados anteriores mostraron que la estimulación del RLH provoca un aumento en los niveles del ARNm de MKP-3 por un mecanismo mediado por AMPc, efecto que alcanza un valor máximo entre las 2 y 3 horas de estimulación. A continuación se analizó si este efecto ocurre como consecuencia de la activación de la transcripción génica, de la estabilización del mensajero o involucra ambos mecanismos. Con este fin, evaluamos los niveles del ARNm de MKP-3 en células estimuladas con 8Br-AMPc, en presencia o ausencia de un inhibidor de la transcripción, actinomicina D (Act D, 3 µg/ml). Determinamos que la inhibición de la transcripción evita el incremento del ARNm producido por el AMPc (Figura 12).

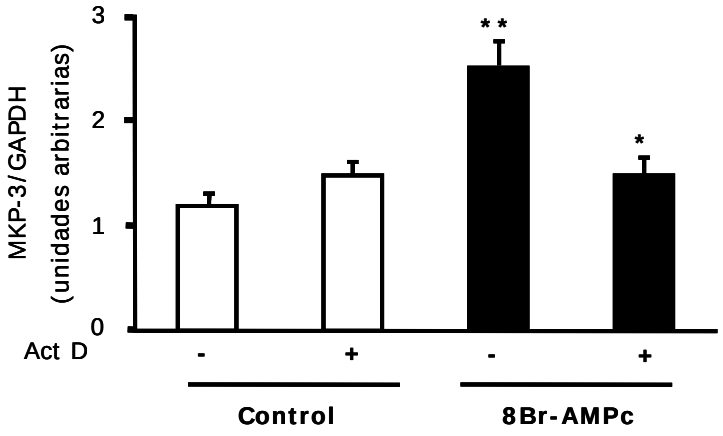


Figura 12. Efecto de la actinomicina D sobre los niveles del ARNm de MKP-3 en células de Leydig MA-10 estimuladas con AMPc. Las células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 2 horas, en presencia o ausencia de actinomicina D (Act D, 3 µg/ml). Se evaluó el nivel de expresión del ARNm de MKP-3 y de GAPDH mediante PCR en tiempo real. El gráfico muestra la relación MKP-3/GAPDH en unidades arbitrarias. Los valores representan la media ± ES de dos experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. *, $P < 0,05$ vs células incubadas con 8Br-AMPc en ausencia de Act D; **, $P < 0,01$ vs. Control en ausencia de Act D.

Dado que la Act D disminuye la acumulación del mensajero, se infiere que hCG promueve la transcripción del gen DUSP6, el cual codifica para MKP-3. Por lo tanto este resultado sugiere que una posible estabilización del mensajero, como se ha descripto en otros sistemas (*Bermudez y col., 2011*), tiene poca o nula participación en el incremento de los niveles del ARNm de MKP-3 en células de Leydig estimuladas por hCG.

I.1.3. Determinación de la estabilidad del ARNm de MKP-3

Con el fin de confirmar que la estabilidad del ARNm de MKP-3 no se modifica por hCG/AMPc se realizaron experimentos de *pulse and chase*, los que permiten evaluar la velocidad de decaimiento del ARNm y los efectos de la estimulación sobre este parámetro. El protocolo incluye una etapa durante la cual las células se incuban en presencia o ausencia (control) de estímulo durante el tiempo necesario para acumular el ARNm a valorar. A continuación, se agrega Act D y 30 minutos después (tiempo de *pulse and chase* = 0) se inicia el procesamiento de las células a diferentes tiempos. En nuestro caso las células se incubaron sin (control) o con 8Br-AMPc durante 2 horas (tiempo de máxima inducción del ARNm por 8Br-AMPc) y luego del agregado de la Act D se procesaron a diferentes tiempos (Figura 13, Panel A). Se evaluaron los niveles del ARNm de MKP-3, los cuales se expresaron en porcentaje, tomando como 100% el nivel correspondiente a tiempo 0 min. (Figura 13, Panel B).

El gráfico de la figura 13 muestra que los niveles del ARNm de MKP-3 decaen con similar velocidad en las células controles y estimuladas, lo cual se confirma por los valores de tiempo de vida media calculados: t½ (control)= 50 min, t½ (8Br-AMPc)= 52 min. Estos resultados sugieren que el incremento en los niveles de ARNm alcanzados en células estimuladas se debe a un aumento en la transcripción del gen DUSP6 y no a un aumento en la estabilidad del ARNm correspondiente. Más aún, estos resultados son compatibles con el hecho que la Act D disminuye el incremento en los niveles del ARNm de MKP-3 por 8Br-AMPc, descripto en la figura 12.

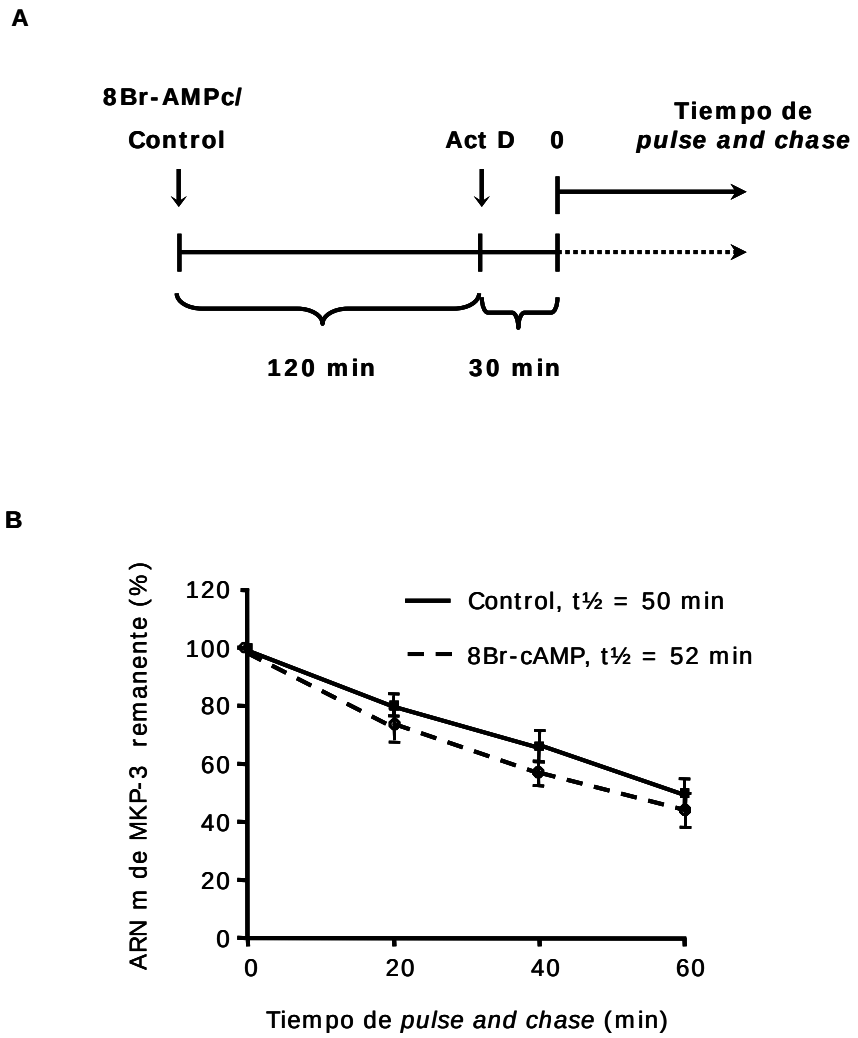


Figura 13. Análisis de la estabilidad del ARNm de MKP-3 en células de Leydig de la línea MA-10. Las células fueron privadas de suero por 24 h, luego fueron incubadas con o sin 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 2 h e incubadas con Act D por diferentes tiempos (30 minutos de Act D correspondiente a *chase time* = 0) **(A)**. El ARN total fue purificado y sometido a transcripción reversa y a PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para MKP-3 y para GAPDH como control. Los resultados son expresados como porcentaje (valor a tiempo cero: 100%) **(B)**. Los valores representan la media ± ES de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey.

I.1.4. Análisis de la participación de ERK1/2 en la acción del AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-3

Se ha demostrado que en determinados sistemas la activación de la transcripción del gen DUSP6 es dependiente de la actividad de ERK1/2. En células MA-10, la activación del RLH provoca la activación del ERK1/2 a través de un mecanismo dependiente de la activación de Ras por PKA (*Hirakawa y Ascoli, 2003*). Este conocimiento nos llevó a preguntarnos si la transcripción del gen DUSP6, que desencadena la activación del RLH, requiere la actividad del ERK1/2.

Para establecer si la inducción de MKP-3 provocada por AMPc es dependiente de la actividad de ERK1/2, se investigó la capacidad del 8Br-AMPc de inducir la expresión de MKP-3 en condiciones en las que se bloquea la activación de esa quinasa. Para esto se utilizó el compuesto PD98059 (50 µM), un inhibidor de MEK1/2 –quinasas río arriba de ERK1/2– que impide la activación de ERK1/2. Se evaluaron los niveles del ARNm correspondiente a MKP-3 en células que se preincubaron con o sin el inhibidor PD98059 y luego se incubaron en presencia o ausencia de 8Br-AMPc.

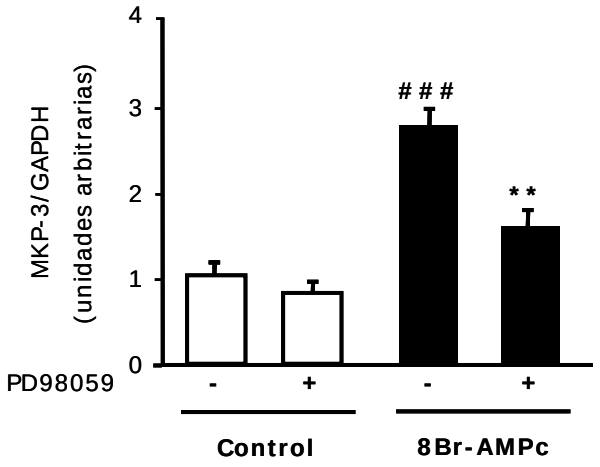


Figura 14. Efecto de ERK1/2 sobre los niveles del ARNm de MKP-3 en células de Leydig MA-10 estimuladas con AMPc. Células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 h, luego fueron estimuladas con 8BR-AMPc 0,5 mM durante 3 h, en presencia o ausencia PD98059 (50 µM). Los niveles de ARNm correspondientes a MKP-3 y GAPDH (control) se analizaron por PCR en tiempo real. El gráfico muestra la relación de intensidades MKP-3/GAPDH en unidades arbitrarias (panel inferior). Los valores representan la media ± ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. **, P< 0,01 vs células tratadas con 8Br-AMPc en ausencia de PD98059; ###, P< 0,001 vs control en ausencia de PD98059.

El análisis por PCR en tiempo real mostró que el 8Br-AMPc incrementa los niveles del mensajero correspondiente a MKP-3 y que el inhibidor PD98059 disminuye la magnitud de este efecto (Figura 14). Este hecho sugiere que el mecanismo por el cual el AMPc dispara la inducción de MKP-3 involucra la actividad de ERK1/2.

I.2. Efecto de la estimulación sobre los niveles y localización subcelular de la proteína MKP-3

MKP-3 es una proteína citoplasmática. Debido a su capacidad de unir a ERK1/2 en el núcleo y transportar la forma desfosforilada hacia el citosol luego del estímulo, es factible detectarla también en esa organela.

Luego que demostramos que la activación del RLH regula MKP-3 a nivel transcripcional en células del Leydig MA-10, analizamos los niveles de la proteína y su localización subcelular en este sistema.

I.2.1. Efecto del AMPc sobre los niveles de la proteína MKP-3

A continuación valoramos los niveles de la proteína MKP-3 mediante Western blot. Las células de la línea MA-10 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego incubadas en presencia o ausencia de 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 2 horas. Luego se purificaron las proteínas totales y se evaluó el nivel de expresión de MKP-3. Los niveles de la proteína MKP-3 se vieron aumentados en el caso de las células estimuladas (Figura 15).

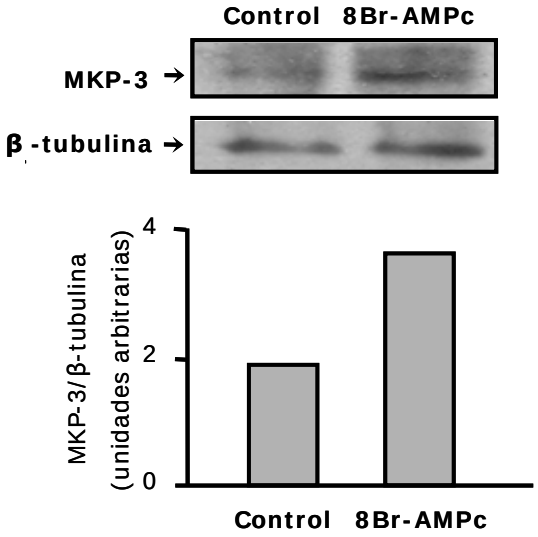


Figura 15. Efecto de 8Br-AMPc sobre los niveles de la proteína MKP-3 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 2 horas. Se obtuvieron las proteínas totales y se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-MKP-3. En el panel superior se muestra el Western blot de un experimento representativo repetido al menos 3 veces. En el panel inferior se grafica la cuantificación de los niveles de la proteína MKP-3, normalizados contra la señal de la proteína β-tubulina, evaluados a partir de la densidad óptica de cada banda.

I.2.2. Localización subcelular de MKP-3 en células de Leydig MA-10

Con el fin de determinar la localización subcelular de MKP-3 en células de Leydig, se realizaron estudios de inmunocitoquímica. Las células MA-10 fueron cultivadas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina, luego fueron privadas de suero por 24 horas e incubadas en presencia de 8Br-AMPc durante los tiempos indicados. Luego del tratamiento las células fueron fijadas y tratadas en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos para la visualización de las mismas mediante microscopía de fluorescencia (Figura 16). MKP-3 fue detectada tanto en núcleo como en citoplasma en células no estimuladas. La estimulación con 8Br-AMPc aumentó la intensidad de la señal específica en ambos compartimentos en forma dependiente del tiempo.

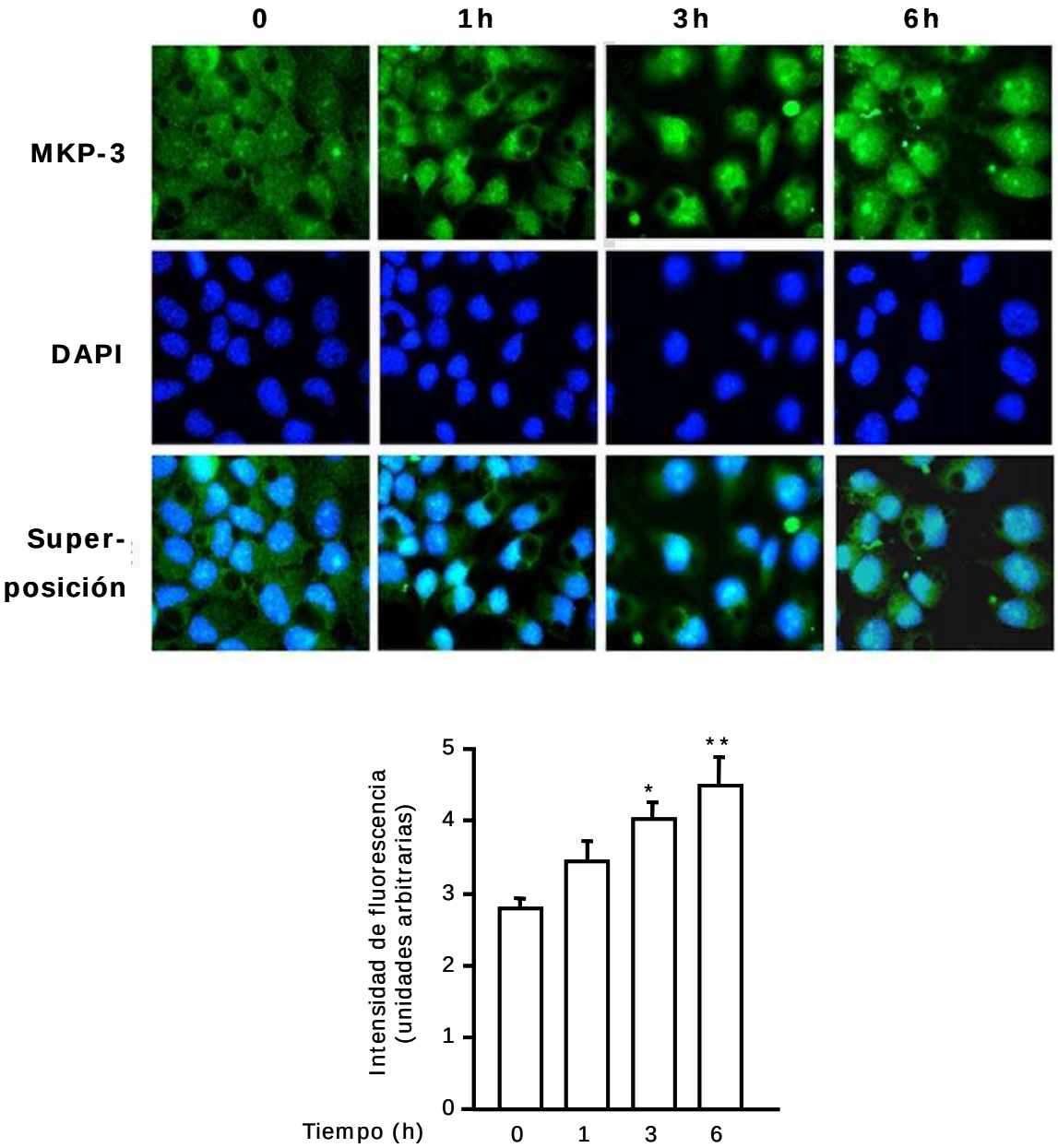


Figura 16. Análisis de la distribución subcelular de la proteína MKP-3 en células de Leydig MA-10 por microscopía de fluorescencia. Las células MA-10 se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 15.000 células/cm^2. Al día siguiente fueron privadas de suero por 24 h y luego incubadas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante los tiempos indicados. A continuación las células fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo específico anti-MKP-3 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). La inmunomarcación fue analizada con un microscopio de fluorescencia (panel superior). La intensidad de la fluorescencia de cada célula fue evaluada (80-100 células por tratamiento), normalizada contra el área correspondiente y expresada en unidades arbitrarias. Los datos representan la media ± ES de tres experimentos independientes (panel inferior). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ vs. tiempo 0.

En conjunto, estos resultados demuestran que en células MA-10, las hormonas LH/hCG promueven el incremento tanto de los niveles del ARNm como de la proteína MKP-3, a través de un mecanismo mediado por el sistema AMPc/PKA

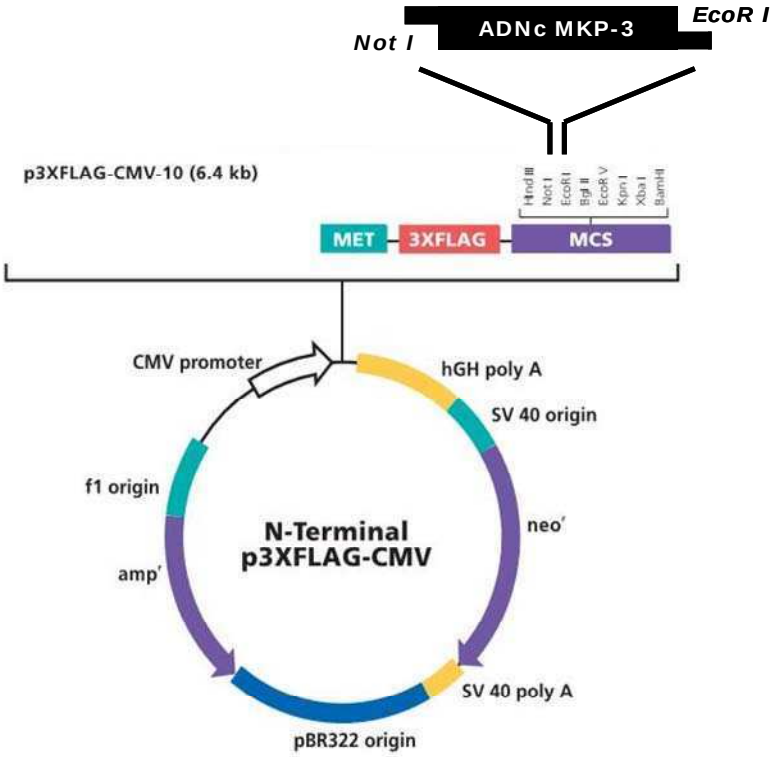
I.3. Regulación post-traduccional de MKP-3

Determinamos que la estimulación de las células MA-10 con hCG o un análogo del AMPc incrementan los niveles del ARNm y de la proteína MKP-3. Si bien el aumento de la cantidad de proteína puede ser atribuido al aumento del ARNm, no puede desestimarse que exista una regulación post-traduccional que estabilice la proteína. Para comprobar esta posibilidad se hicieron los experimentos que se describen a continuación.

I.3.1. Estrategia para la sobreexpresión transitoria de MKP-3

Con el fin de determinar si en células de Leydig LH/hCG regula los niveles de MKP-3 por acción a nivel post-traduccional, se utilizó como estrategia la transfección transitoria con un vector que contiene el ADNc de MKP-3 bajo el control de un promotor constitutivo. Esta estrategia permite el análisis de la regulación de los niveles de la proteína MKP-3 en forma independiente de la regulación a nivel transcripcional.

Para cumplir este objetivo se realizó el clonado del ADNc de MKP-3 en el vector p3XFLAG-CMV-10. Este vector tiene la propiedad de generar una proteína de fusión con un péptido en el extremo amino terminal (flag), permitiendo de esta forma detectar eficientemente la proteína recombinante mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico (anti-flag). Para obtenerla se extrajo el ARN total de células de Leydig MA-10 cultivadas en presencia de suero (para asegurar la presencia del ARNm correspondiente a MKP-3, en este caso inducido por factores presentes en el suero). A partir de este ARN se realizó una reacción de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar el ADNc de la MKP-3 (fragmento de 1,18 kb). Este fragmento fue clonado en los sitios de restricción *Not I* y *Eco*RI del vector mencionado (Figura 17, Panel superior). Obtenida la construcción necesaria para la sobreexpresión de la proteína de fusión flag-MKP-3 (ver detalles en Materiales y Métodos), ésta fue analizada mediante un mapa de restricción (Figura 17, Panel inferior) y secuenciación.



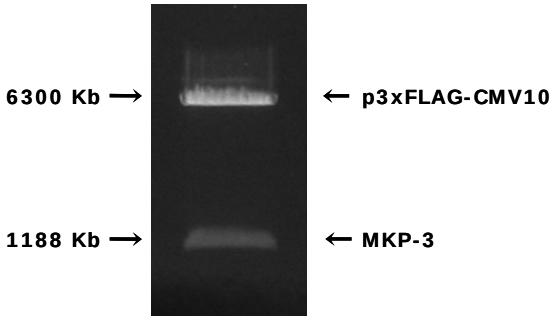


Figura 17. Esquema del vector utilizado para la sobreexpresión de la proteína flag-MKP-3 en células esteroidogénicas. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar mediante RT-PCR el ADNc del gen MKP-3 de ratón a partir del sitio de inicio de la traducción. El producto de la reacción de PCR (1,18 kb) fue clonado en los sitio *Not I* y *Eco*RI del vector de expresión p3XFLAG-CMV-10 para generar la proteína de fusión flag-MKP-3 (Panel superior). Se corroboró la presencia del inserto de 1,18 kb en el vector mediante digestión con las enzimas de restricción *Not I* y *EcoR I* y posterior análisis en gel de agarosa con bromuro de etidio (Panel inferior).

La transfección de las células se realizó utilizando el reactivo Lipofectamina 2000. El protocolo de transfección involucra un primer paso de incubación de las células con la mezcla de Lipofectamina/ADN en un medio libre de antibióticos durante 6 horas. Luego de 24 horas, las células están en condiciones de ser utilizadas en los diferentes experimentos. Con este protocolo se obtiene una eficiencia de transfección del 30% aproximadamente, determinada a partir de la transfección de las células con el vector pRc/CMV-EGFP, el cual sobreexpresa la proteína verde fluorescente (EGFP) y posterior análisis de las células positivas mediante microscopía de fluorescencia.

Una vez obtenida la construcción pFLAG-MKP-3, los cultivos de células de Leydig MA-10 fueron transfectados transitoriamente con dicho vector. Al día siguiente, las células fueron privadas de suero por 24 horas y luego incubadas en presencia o ausencia de 8Br-AMPc durante 2 horas. Posteriormente, se analizaron los niveles de MKP-3 para evaluar la funcionalidad del vector diseñado. Pudimos observar que las células transfectadas transitoriamente con el vector pFLAG-MKP-3 presentaron un incremento en la expresión de la proteína flag-MKP-3. (Figura 18)

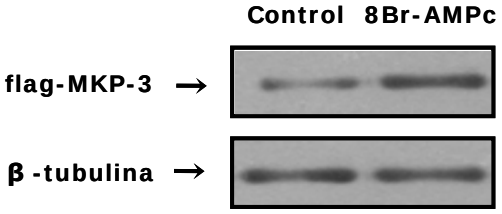


Figura 18. Sobreexpresión de la proteína flag-MKP-3 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron transfectadas con el vector pFLAG-MKP-3. Al día siguiente fueron privadas de suero durante 24 horas y luego incubadas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 2 horas. Se evaluó el nivel de expresión de la proteína flag-MKP-3 mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-flag o anti-β-tubulina como control de carga. La figura muestra un experimento representativo.

I.3.2. Efecto de hCG/ AMPc sobre los niveles de la proteína flag-MKP-3

A continuación evaluamos si hCG regula la expresión de MKP-3 mediante un mecanismo post-traduccional. Para ello, células de la línea MA-10 fueron transfectadas transitoriamente con el vector pFLAG-MKP-3 y estimuladas con hCG durante distintos tiempos. Posteriormente los niveles de la proteína flag-MKP-3 fueron evaluados por Western blot utilizando un anticuerpo anti-flag. Dado que la expresión de la proteína está bajo control de un promotor constitutivo, las diferencias observadas entre las células controles y estimuladas se deben a un efecto post-

traduccional de dicho estímulo. Como se muestra en la figura 19, el tratamiento con hCG produce un aumento transitorio en los niveles de la proteína flag-MKP-3 (Figura 19, Panel A). El aumento es significativo a partir de la hora de estimulación, se mantiene hasta las 4 horas y luego decae. Resultados similares se observaron cuando las células fueron tratadas con 8Br-AMPc (Figura 19, Panel B)

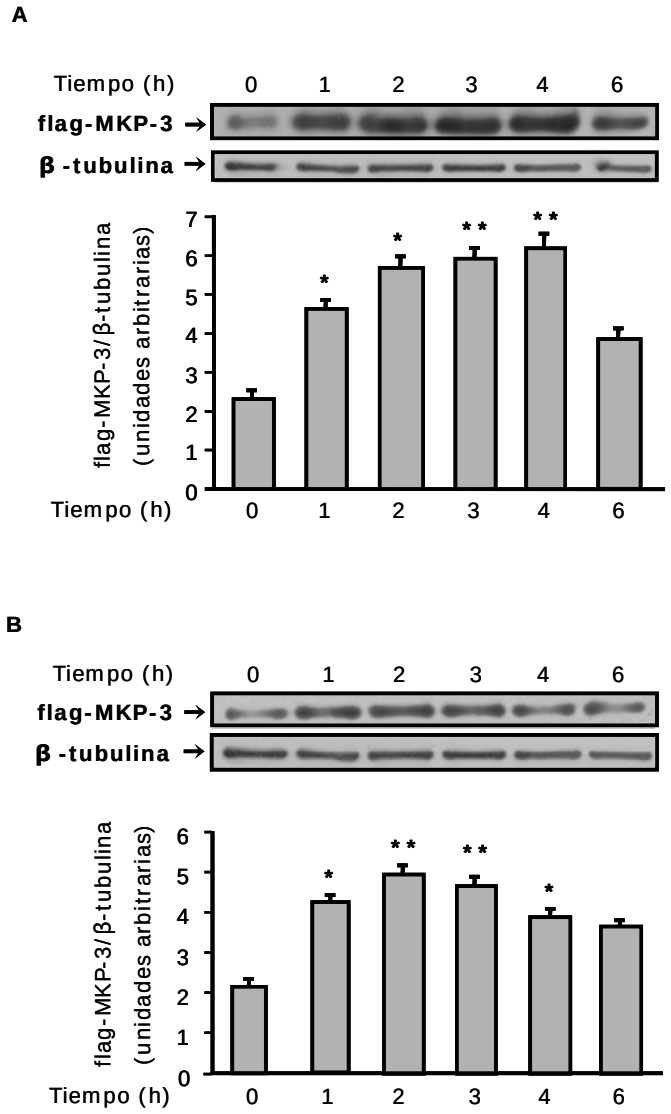


Figura 19. Efecto de hCG/ 8Br-AMPc sobre los niveles de la proteína flag-MKP-3. Células MA-10 fueron transfectadas transitoriamente con la construcción p3xFLAG-CMV10/MKP-3, luego fueron privadas de suero durante 24 h e incubadas con hCG 10 ng/ml **(A)** u 8Br-AMPc 0,5 mM **(B)** durante los tiempos indicados. Se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron por Western blot con el anticuerpo anti-flag. Panel superior: Resultado representativo de tres experimentos independientes. Panel inferior: Cuantificación de las bandas por densitometría, expresando flag-MKP-3/β-tubulina en unidades arbitrarias. Los valores representan la media ± ES. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ vs. tiempo 0.

Con el fin de corroborar que el aumento visto sobre flag-MKP-3 es específico de la proteína y que no está siendo afectado por los aminoácidos agregados por el flag, se utilizó otra construcción con el epitope flag. Esta permite la expresión de la proteína recombinante flag-ERK2. Las células MA-10 fueron transfectadas con dicha construcción y tratadas con 8Br-AMPc 0,5 mM durante distintos tiempos. Luego se analizó por Western blot la expresión de la quimera flag-ERK2 utilizando el anticuerpo anti-flag. Los resultados mostraron que la estimulación con 8Br-AMPc no tuvo efecto alguno sobre los niveles de flag-ERK2 (Figura 20). Esto demuestra que el efecto de hCG/AMPc sobre los niveles de flag-MKP-3 es específico de la proteína MKP-3.

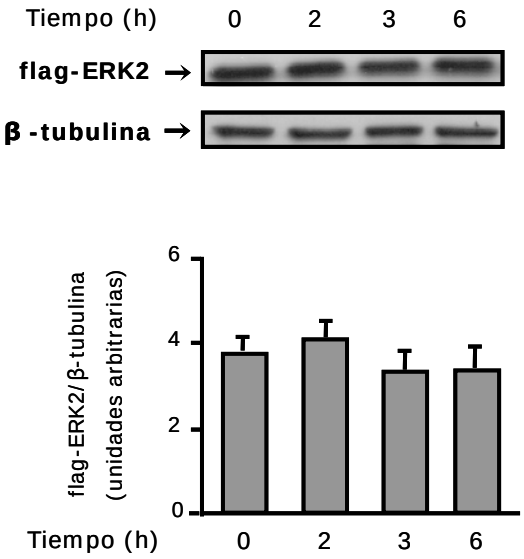


Figura 20. Efecto de 8Br-AMPc sobre los niveles de la proteína flag-ERK2. Células MA-10 fueron transfectadas transitoriamente con la construcción p3xFLAG-CMV10/ERK2, luego fueron privadas de suero durante 24 h e incubadas con 8Br-AMPc 0,5 mM durante los tiempos indicados. Se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron por Western blot con el anticuerpo anti-flag. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría. Panel superior: Resultado representativo de dos experimentos independientes. Panel inferior: Cuantificación de las bandas por densitometría, expresando flag-MKP-3/β-tubulina en unidades arbitrarias. Los valores representan la media ± ES. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey.

En conjunto, estos resultados sugieren que en células estimuladas, la acumulación de flag-MKP-3 se debe probablemente a la estabilización de la proteína mediada por PKA.

II. ANÁLISIS DEL PAPEL FUNCIONAL DE MKP-3 EN LA ACCIÓN DE LH/hCG SOBRE LAS CÉLULAS DE LEYDIG MA-10

II.1. Diseño y validación de la construcción utilizada para disminuir el grado de expresión de la proteína MKP-3

Una estrategia para disminuir el nivel de expresión de una proteína consiste en la expresión de un ARN de interferencia. Con el fin de crear el ARN de interferencia para MKP-3, se diseñaron oligonucleótidos específicos cuya secuencia es idéntica a una región específica del ARNm de MKP-3 (ver Materiales y Métodos). Los oligonucleótidos fueron clonados en el vector pSUPER.retro para obtener la construcción pSUPER.retro-MKP-3. La transfección de las células con esta construcción permite la expresión de un *short hairpin* ARN (shARN) el cual lleva a la degradación específica del ARNm de MKP-3.

Con el fin de evaluar la funcionalidad del shARN diseñado, las células de Leydig MA-10 fueron transfectadas con la construcción pSUPER.retro-MKP-3 (shARN) o con el pSUPER.retro vacío (*Mock*). Luego fueron privadas de suero por 24 horas y a continuación estimuladas con 8Br-AMPc 0,5 mM. Posteriormente se purificó el ARN y se evaluó la expresión del ARN de MKP-3 mediante PCR en tiempo real. En las células que expresan el shARN, la estimulación con 8Br-AMPc provocó un aumento significativamente menor de los niveles del ARNm de MKP-3 que las células transfectadas con el vector vacío (*Mock*) (Figura 21). Esta disminución resultó ser sólo del 30% con respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío y estimuladas, lo cual es consistente con el hecho de que la eficiencia de transfección en dicha línea celular es aproximadamente 30%. Estos resultados sugieren que la construcción es efectiva para disminuir la expresión de MKP-3.

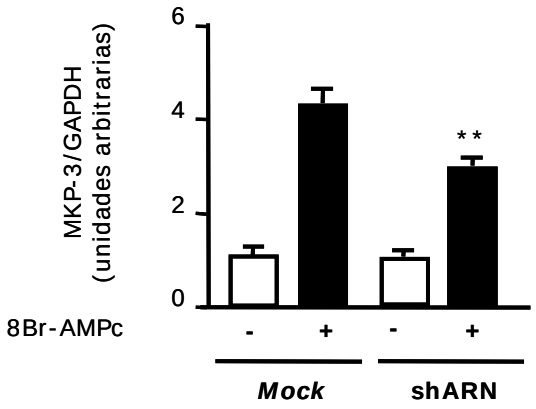


Figura 21. Efecto del shARN sobre los niveles del ARNm de MKP-3. Las células fueron transfectadas con la construcción pSUPER.retro-MKP-3 para la expresión del shARN específico para el bloqueo de la expresión de MKP-3 (shARN) o con el plásmido vacío (*Mock*). Luego fueron privadas de suero y después de 24 h, estimuladas o no con 8Br-AMPc 0,5 mM durante 2 horas. El ARN total fue aislado y sometido a transcripción reversa y a PCR en tiempo real usando oligonucleótidos específicos para MKP-3 y para GAPDH como control. Los valores representan la media ± ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. **, P < 0,01 vs. células *Mock* estimuladas.

Otra estrategia para confirmar la efectividad de la construcción consistió en determinar en qué medida la expresión de la construcción es capaz de reducir el nivel de la proteína recombinante. Para ello, las células de Leydig MA-10 fueron transfectadas con el plásmido pFLAG-MKP-3, para la expresión de flag-MKP-3, en conjunto con el plásmido pSUPER.retro-MKP-3 o pSUPER.retro vacío. Luego fueron privadas de suero y luego de 24 horas estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM). Al término de la estimulación las células fueron lisadas y las proteínas totales analizadas por Western blot con el anticuerpo anti-flag. Como se puede ver en la figura 22, en el shARN redujo los niveles de la proteína flag-MKP-3 en comparación con las células que no lo expresan (*Mock*)

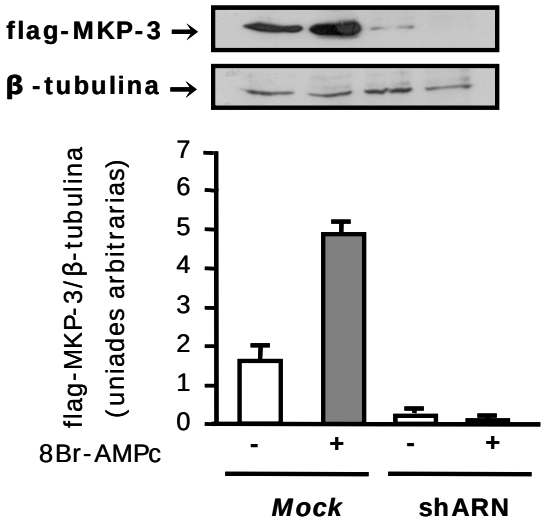


Figura 22. Análisis de la funcionalidad del shARN para MKP-3. Las células fueron transfectadas con la construcción pFLAG-MKP-3 en conjunto con el plásmido pSUPER.retro-MKP-3 (shARN) o con el plásmido vacío (*Mock*). Luego fueron privadas de suero por 24 h y estimuladas o no con 8Br-AMPc 0,5 mM. Las células fueron lisadas y las proteínas totales fueron analizadas mediante Western blot con un anticuerpo anti-flag. Los valores representan la media ± ES de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

II.2. Efecto del nivel de expresión de MKP-3 sobre el grado de fosforilación de ERK1/2

Se ha demostrado que MKP-3 desfosforila específicamente a ERK1/2 y que en condiciones basales retiene a ERK1/2 en la forma desfosforilada en el citoplasma (*Karlsson y col., 2004*). A continuación describimos los experimentos que realizamos para evaluar el efecto de la sobreexpresión de MKP-3 sobre el grado de activación de ERK1/2 mediante Western blot.

Las células MA-10 fueron transfectadas con el plásmido pFLAG-MKP-3 o con el plásmido vacío. Luego fueron privadas de suero por 24 horas y estimuladas con 8Br-AMPc durante los tiempos indicados. Las células fueron lisadas y las proteínas fueron analizadas mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti-P-ERK1/2. Observamos que en todos los tiempos de estimulación con 8Br-AMPc (20, 60 y 120 minutos) el nivel de fosforilación de ERK1/2 es menor en las células que sobreexpresan la proteína MKP-3 respecto de las células controles transfectadas con el plásmido vacíon (*Mock*). Por el contrario, en las células que sobreexpresan el shARN

de MKP-3, el tratamiento con AMPc fue capaz de incrementar los niveles de fosfo-ERK1/2 (Figura 23).

Este resultado demuestra que la proteína MKP-3 sobreexpresada es funcional ya que reduce la actividad de ERK1/2 promovida por AMPc. También confirmamos la funcionalidad del shARN de MKP-3, ya que produce un mayor nivel de activación de ERK1/2 frente a la estimulación con AMPc y además prolonga el marco temporal de acción de esta quinasa.

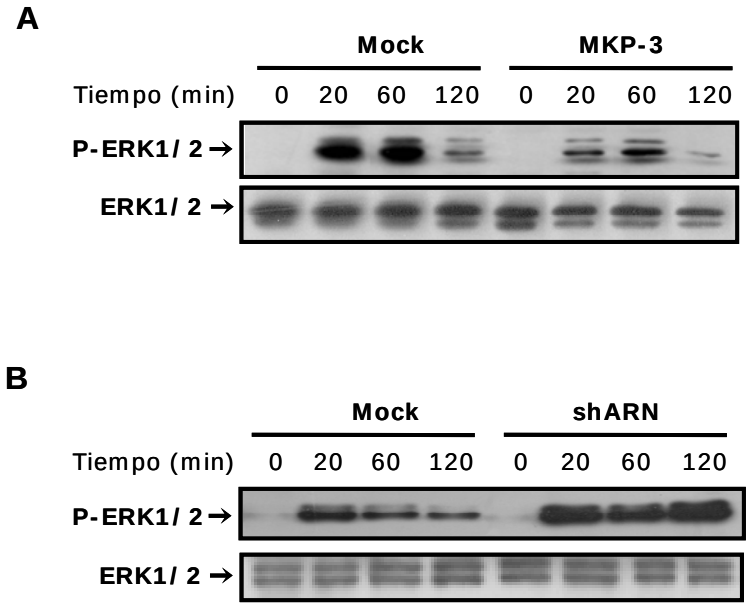


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de MKP-3 sobre los niveles de P-ERK. Las células fueron transfectadas con el plásmido pFLAG-MKP-3 para la sobreexpresión de flag-MKP-3 (MKP-3) o con el plásmido vacío (*Mock*) (**A**), o con el pSUPER-retro-MKP-3 para la expresión del shARN contra MKP-3 (shARN) o el vector vacío (*Mock*) (**B**). Luego las células fueron privadas de suero por 24 h y estimuladas con 8Br-AMPc 0,5 mM por los tiempos indicados. Las células fueron lisadas y los niveles de P-ERK1/2 o ERK1/2 total fueron analizados por Western Blot. La figura muestra un Western blot representativo de cada caso. Cada experimento fue realizado tres veces con resultados similares.

II.3. Efecto de MKP-3 sobre la expresión de p21 en células de Leydig MA-10

En general, es aceptado que los sustratos de las MKPs son las las MAPK. Sin embargo, hay algunas evidencias que sugieren que las MKPs pueden desfosforilar *in vivo* sustratos diferentes a las MAPKs (*Huang y Tan, 2012*). Por ejemplo, como se

mencionó en la introducción de este trabajo, MKP-3 interactúa con la proteína FOXO1 y promueve su desfosforilación. Este evento lleva a la translocación de FOXO1 al núcleo donde interviene en la activación de genes de la gluconeogénesis (*Jiao y col., 2012; Wu y col., 2010*). FOXO1 participa en la regulación de genes relacionados no sólo con el control del metabolismo sino también con otros procesos, como por ejemplo el arresto del ciclo celular a través de la inducción del inhibidor del ciclo celular p21 (*Roy y col., 2010*). Por lo tanto, nosotros postulamos que la activación del RLH podría modular la expresión de p21 como mecanismo para controlar la proliferación de las células de Leydig y que MKP-3 podría intervenir en esta regulación a través de desfosforilación de FOXO1. Los siguientes experimentos fueron planeados con el fin de demostrar esta hipótesis.

II.3.1. Análisis del efecto de hCG y AMPc sobre la expresión de p21

Con el fin de determinar el efecto de la activación del RLH sobre la expresión de p21 se evaluó el efecto de 8Br- AMPc sobre la expresión de dicho gen. Evaluamos los niveles del ARNm de p21 mediante PCR en tiempo real, utilizando oligonucleótidos específicos para p21. Las células de Leydig MA-10 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas durante distintos tiempo con 8Br-AMPc 0,5 mM. A continuación se purificó el ARN total y se evaluaron los niveles de ARNm de p21 y de GAPDH (control). Los resultados mostraron que el 8Br-AMPc produce un aumento transitorio en los niveles de dicho mensajero. Los niveles se incrementan significativamente a partir de las 2 horas, tiempo en el que se registra el máximo incremento (2,5 veces respecto al control), y retornan a los niveles basales luego de 6 horas de tratamiento (Figura 24).

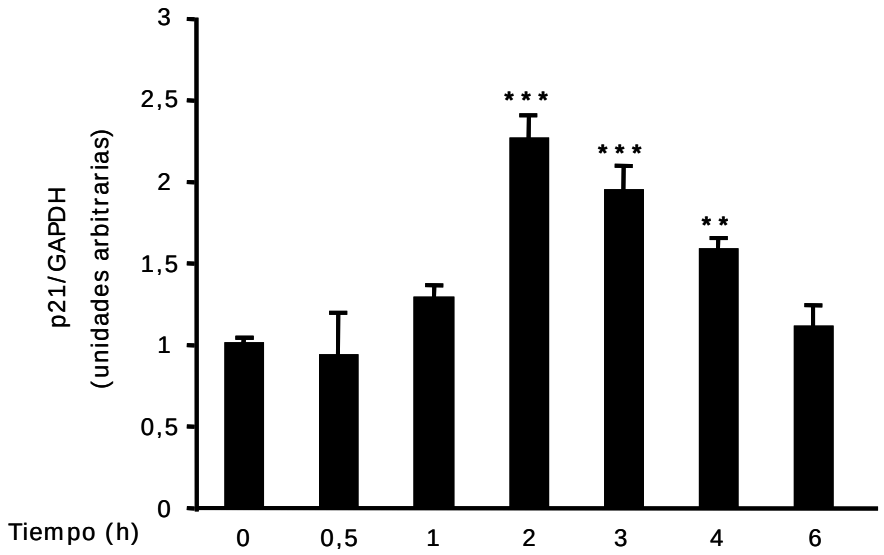


Figura 24. Aumento de los niveles de ARNm de p21 por 8Br-AMPc. Las células fueron privadas de suero durante 24 h y luego incubadas con 8Br-AMPc 0,5 mM durante los tiempos indicados. EL ARN total fue purificado y sometido a transcripción reversa con oligonucleótidos específicos para p21 y para GAPDH. Los datos representan la media ± ES de tres experimentos independientes. ***, P < 0,001 y **, P < 0,01 vs tiempo 0, por ANOVA seguido de test de Tukey.

Seguidamente comparamos el efecto de 8Br-AMPc (0,5 mM) y hCG (10 ng/ml) sobre la inducción de p21. Los resultados obtenidos mostraron que la estimulación con la hormona o con 8Br-AMPc (2 h) produce un aumento de similar magnitud sobre los niveles del ARNm de p21 (Figura 25).

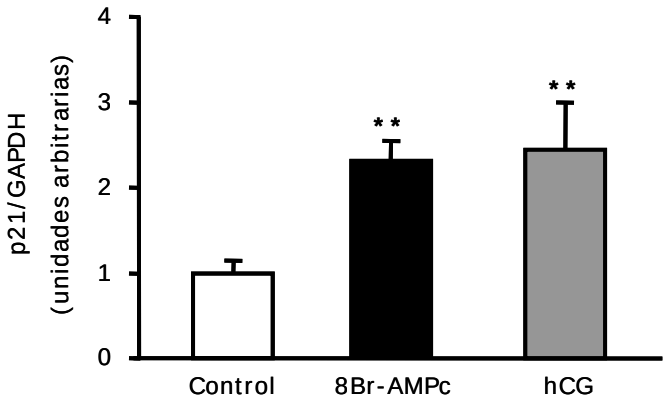


Figura 25. Efecto de hCG y 8Br-AMPc sobre los niveles de ARNm de p21. Las células fueron incubadas con hCG (10ng/ml) u 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 2 horas. EL ARN total fue purificado y sometido a transcripción reversa con oligonucleótidos específicos para p21 y para GAPDH. Los datos representan la media ± ES de tres experimentos independientes. **,P < 0,01 vs control, por ANOVA seguido de test de Tukey.

Dado que la hormona y el derivado del AMPc producen un aumento de similar magnitud en los niveles del ARNm, los experimentos siguientes se realizaron estimulando las células con el derivado del AMPc.

II.3.2. Análisis del efecto de MKP-3 sobre la expresión de p21

Después de haber comprobado que la estimulación del RLH conduce a un aumento de los niveles del ARNm correspondiente a p21, analizamos si este efecto es modulado por la expresión de MKP-3. Para ello, las células fueron transfectadas con el plásmido pSUPER.retro-MKP-3 (*sh*ARN) o pSUPER.retro vacío (*Mock*), posteriormente fueron privadas de suero por 24 horas y estimuladas con 8Br-AMPc durante 2 horas. El ARN fue purificado y analizado por PCR en tiempo real. Como se muestra en la figura 26 la disminución de la expresión de MKP-3 por medio de shARN reduce el efecto del AMPc sobre los niveles de ARNm de p21. Estos resultados sugieren que la expresión de MKP-3 estaría involucrada en el mecanismo que regula la expresión de p21 estimulada por AMPc.

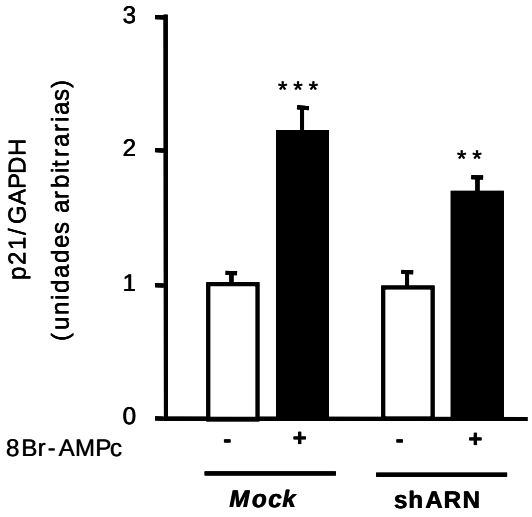


Figura 26. Aumento de los niveles de ARNm de p21 por 8Br-AMPc mediante un mecanismo dependiente de MKP-3. Las células fueron transfectadas con el plásmido pSUPER.retro-MKP-3 para la expresión de shARN contra MKP-3 (shARN) o con el vector vacío (*Mock*) y posteriormente incubadas con 8Br-AMPc 0,5 mM durante 2 h. EL ARN total fue purificado y sometido a transcripción reversa con oligonucleótidos específicos para p21 y para GAPDH. Los datos representan la media ± ES de tres experimentos independientes. ***, P < 0,001 vs *Mock* sin tratar; **, P < 0,01 vs *Mock* tratadas con 8Br-AMPc, por ANOVA seguido de test de Tukey.

Los resultados precedentes muestran que MKP-3 promueve la expresión de p21, sin embargo desconocemos el mecanismo molecular que explica este efecto. Una posibilidad involucra la desfosforilación y activación de FOXO1 por MKP-3. Aunque muy someramente nosotros hemos analizado esa posibilidad, para lo cual evaluamos los niveles de FOXO1 fosforilado (P-FOXO1) en función del tiempo de estimulación con 8Br-AMPc. Dado que FOXO1 es fosforilado por AKT (*Martelli y col., 2012*), analizamos también los niveles de la forma fosforilada y activa de esta quinasa. Un ensayo preliminar mostró un incremento rápido de los niveles de la forma fosforilada de AKT (P-AKT) y un incremento transitorio de los niveles de la forma fosforilada de FOXO1 (Figura 27). El incremento inicial en la fosforilación de FOXO1 puede ser el resultado de la activación de AKT mientras que la posterior desfosforilación podría involucrar la participación de MKP-3. De todas maneras es importante destacar que estos resultados son preliminares y no tienen valor estadístico como para aseverar una acción de MKP-3 sobre FOXO1/p21.

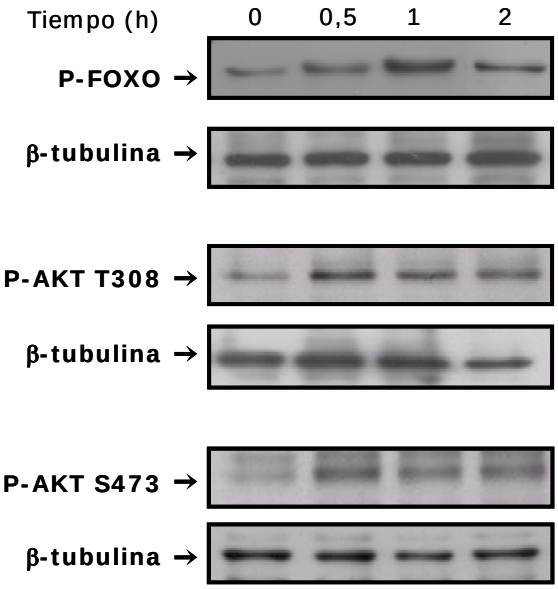


Figura 27. Efecto del AMPc sobre los niveles de P-FOXO y P-AKT. Las células fueron privadas de suero por 24 h y estimuladas o con 8Br-AMPc 0,5 mM por los tiempos indicados. Las células fueron lisadas y las proteínas totales fueron analizadas mediante Western blot con un anticuerpo anti-P-FOXO, anti-PAKT T308, anti-P-AKT S473 o anti β-tubulina. La figura muestra un Western blot representativo de cada caso. Cada experimento fue realizado dos veces con resultados similares.

III. REGULACIÓN DE MKP-1 EN CÉLULAS de LEYDIG MA-10: IMPLICANCIA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA

III.1. Determinación de la estabilidad de la proteína MKP-1

En nuestro laboratorio, se ha demostrado que hCG regula la expresión a nivel transcripcional de MKP-1. Se demostró que LH/hCG regula estrictamente la expresión de esta fosfatasa por un efecto a nivel transcripcional como así también promoviendo modificaciones post-traduccionales que afectan la vida media de la proteína. Además, la inducción de MKP-1 contribuye a acotar el marco temporal de actividad de ERK1/2, evento que promueve el cierre de la acción hormonal sobre la inducción de genes dependientes de ERK1/2 que son importantes para el proceso esteroidogénico. Finalmente estos eventos disparados por la inducción de MKP-1 llevan a frenar la producción de esteroides *(Brion y col., 2011).*

Se demostró que en células MA-10 que sobreexpresan la proteína flag-MKP-1, hCG y AMPc aumentan los niveles de la proteína conforme aumenta el tiempo de estimulación, detectando un máximo a las 2 h del tratamiento. Esto indicó que hCG/AMPc promueve la estabilización de la proteína ya que la transcripción del gen es regulada, en este caso, por un promotor constitutivo *(Brion y col, 2011).* La siguiente pregunta fue cuál era la modificación post-traduccional provocada por el tratamiento hormonal que conducía a la estabilización de la proteína.

El análisis de la secuencia aminoacídica de MKP-1 revela varios potenciales sitios consenso de fosforilación por diferentes quinasas. Sin embargo, la fosforilación en células intactas se restringe a un número limitado de sitios, entre ellos los residuos S359 y S364 del extremo carboxilo terminal. La fosforilación en estos sitios por acción de ERK1/2 impide la degradación de MKP-1 por el proteosoma *(Brondello y col 1999*). Por otro lado, hay trabajos que demuestran que la activación de ERK1/2 induce la degradación de MKP-1 promoviendo la fosforilación en los residuos S296 y S323 (*Choi y col., 2006*). Por lo tanto, nos interesó determinar en qué medida la fosforilación en los sitios que confieren estabilidad (S359 y S364) e inestabilidad (S296 yS323) contribuyen al aumento en los niveles de flag-MKP-1 y de esta manera inferir acerca de los mecanismos que regulan la inducción post-traduccional de MKP-1 por hCG/AMPc. Con ese fin obtuvimos, por mutagénesis sitio dirigida a partir del plásmido pFLAG-MKP-1, las construcciones doblemente mutada en dichos sitios, pFLAG-MKP-1-S359A-S364A y pFLAG-MKP-1-S296A-S323A. Luego se analizó el efecto de la estimulación con 8Br-cAMP sobre los niveles de las quimeras.

Las células de Leydig de la línea MA-10 fueron transfectadas con las construcciones para la expresión de la proteína flag-MKP-1 *wild type* (WT) o sus formas doblemente mutadas. Al día siguiente fueron privadas de suero y luego de 24 h fueron incubadas con 8Br-AMPc durante 30 minutos. Luego se agregó al medio de cultivo cicloheximida (CHX, 2 µg/ µl) durante tiempos variables y, al término de las incubaciones, se obtuvieron los lisados celulares (Figura 28). Posteriormente, los niveles de la proteína flag-MKP-1 o de sus variantes fueron evaluados por Western blot utilizando un anticuerpo anti-flag.

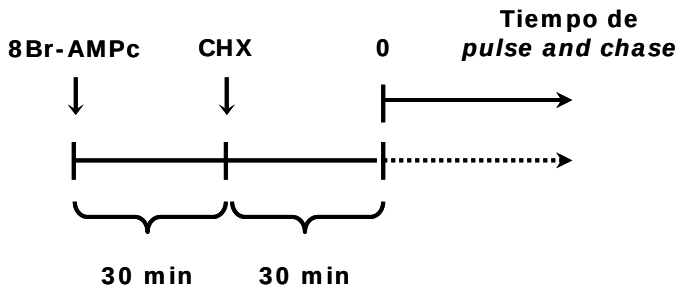


Figura 28. Esquema del tratamiento de las células para el análisis de la estabilidad de flag-MKP-1. Células MA-10 fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes y luego privadas de suero por 24 h. Seguidamente se agregó al medio de cultivo 8Br-AMPc (0,5 mM) y 30 minutos después, cicloheximida (CHX, 2 µg/ µl). A diferentes tiempos de tratamiento las células se procesaron para analizar los niveles de las proteínas recombinantes.

Los resultados mostraron que las formas doblemente mutadas poseen un tiempo de vida media diferente a la forma WT. La forma mutada en los sitios S359 y S364 se degrada más rápidamente que la forma WT (Figura 29). El análisis de los niveles de la forma mutada flag-MKP-1-S296A-S323A reveló que ésta tiene un tiempo de vida media mayor que la forma WT (Figura 30).

Estos resultados sugieren que la estabilidad de la proteína MKP-1 depende de la fosforilación de la misma en distintos sitios específicos, los cuales pueden contribuir a la acumulación o la degradación de la misma. Dado que la vida media de flag-MKP-1 WT es mayor que la de la forma flag-MKP-1 S359A-S364A y menor que la de la flag-MKP-1 S296A-S323A, se infiere que la estabilidad inducida por hCG/AMPc de MKP-1 representa el balance neto de los efectos que produce la fosforilación en los cuatro sitios mencionados.

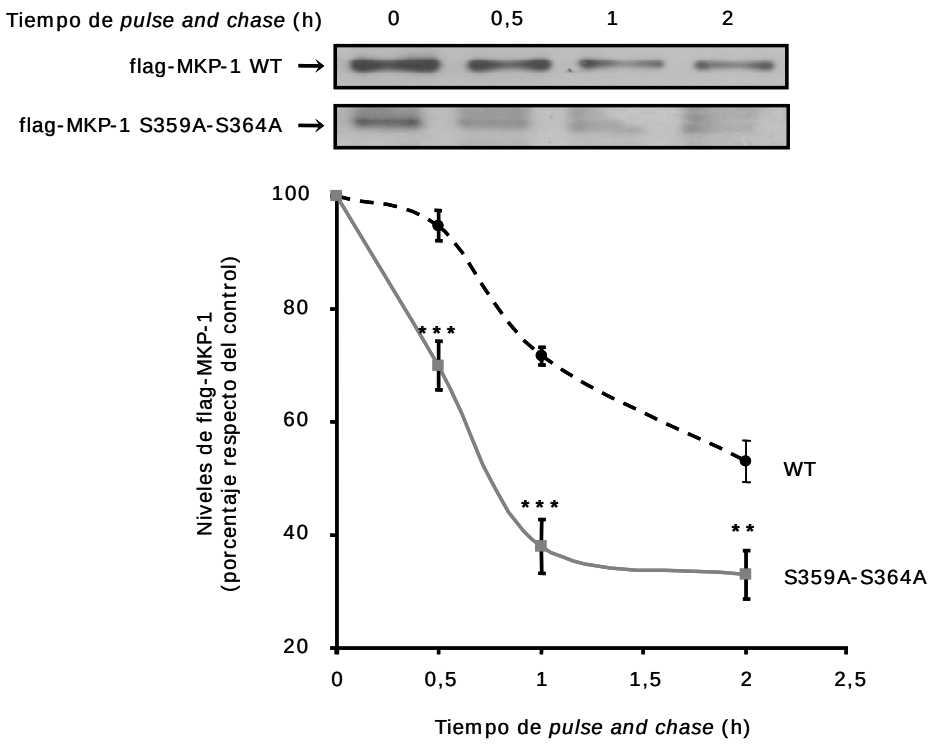


Figura 29. Análisis del efecto de la fosforilación en S359 y S364 sobre la estabilidad de flag-MKP-1. Células MA-10 fueron transfectadas con los plásmidos pFLAG-MKP1 WT ó pFLAG-MKP-1-S359A-S364A y luego privadas de suero por 24 h. Seguidamente se agregó al medio de cultivo 8Br-AMPc y 30 minutos después, cicloheximida (CHX, 2 µg/ µl). A diferentes tiempos de tratamiento las células se procesaron para analizar los niveles de las proteínas recombinantes por Western blot con el anticuerpo anti-flag. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría. Los niveles de β-tubulina fueron analizados como control de carga, obteniendo bandas de similar intensidad óptica en todas las calles (Datos no mostrados). Panel superior: Resultado representativo de tres experimentos independientes. Panel inferior: Cuantificación de las bandas por densitometría, expresando los niveles de las proteínas recombinantes en unidades arbitrarias. Los datos representan la media ± ES. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. ** ,P < 0,01; ***, P < 0,001 vs flag-MKP-1 WT con el mismo tiempo de tratamiento.

Por otro lado, en nuestro laboratorio ha sido demostrado que MKP-1 modula la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis. Particularmente, la inducción de MKP-1 se asocia con una reducción del efecto del AMPc sobre la inducción de la proteína StAR. En vista de los resultados que muestran que la fosforilación promovida por hCG/AMPc vía ERK1/2 afecta la acumulación de MKP-1, postulamos que esta fosforilación de MKP-1 se reflejará en la acción de la misma sobre StAR o los factores que median la inducción de esta proteína, como se verá en la sección siguiente.

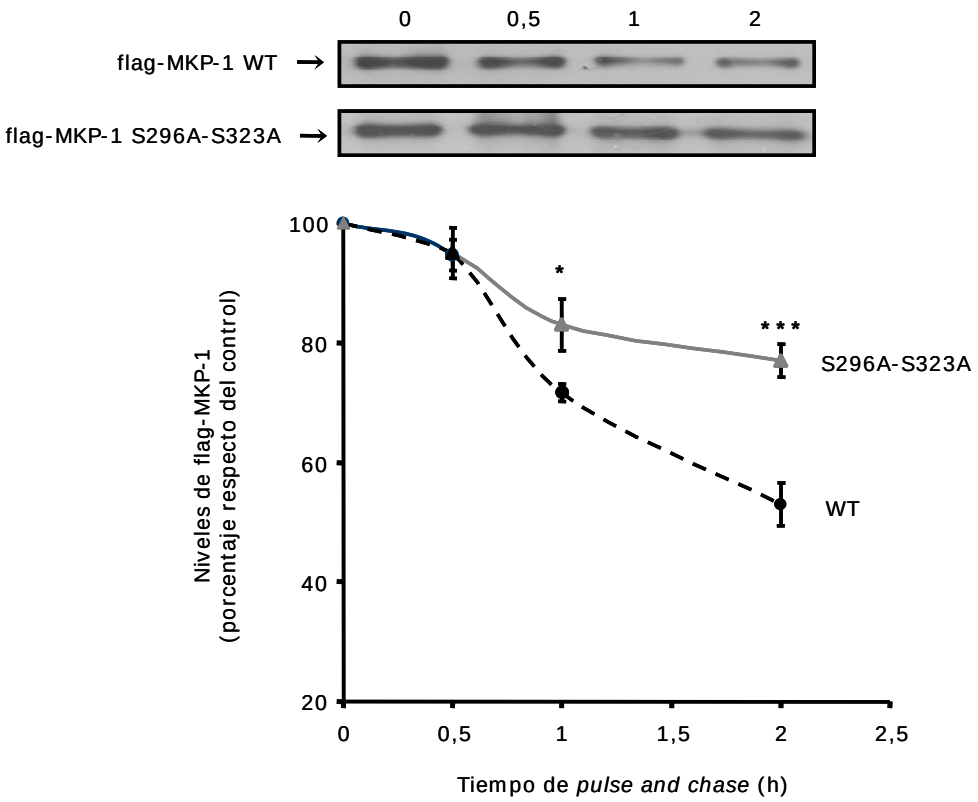


Figura 30. Análisis del efecto de la fosforilación en S296 y S323 sobre la estabilidad de flag-MKP-1. Células MA-10 fueron transfectadas con los plásmidos pFLAG-MKP1 WT ó pFLAG-MKP-1-S296A-S323A y luego privadas de suero por 24 h. Seguidamente se agregó al medio de cultivo 8Br-AMPc y 30 minutos después, cicloheximida (CHX, 2 µg/ µl). A diferentes tiempos de tratamiento las células se procesaron para analizar los niveles de las proteínas recombinantes por Western blot con el anticuerpo anti-flag. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría. Los niveles de β-tubulina fueron analizados como control de carga, obteniendo bandas de similar intensidad óptica en todas las calles (Datos no mostrados). Panel superior: Resultado representativo de tres experimentos independientes. Panel inferior: Cuantificación de las bandas por densitometría, expresando los niveles de las proteínas recombinantes en unidades arbitrarias. Los datos representan la media ± ES. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. *, $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs flag-MKP-1 WT con el mismo tiempo de tratamiento.

III.2. Efecto de la estimulación con 8Br-AMPc sobre la expresión de NUR77

En nuestro laboratorio se ha demostrado que, en células de Leydig de la línea MA-10, la expresión de MKP-1 reduce los niveles del ARNm de STARD1, la actividad del promotor del gen STARD1 y, consecuentemente, la síntesis de esteroides (*Brion y col, 2011*).

Se sabe que la inducción del gen STARD1 requiere la regulación dependiente de LH/AMPc de varios factores de transcripción como el factor esteroidogénico 1 (SF1)

y NUR77 (*Martin y Tremblay, 2009*). Dado que se ha documentado que la inducción del gen NUR77 precede la inducción del gen STARD1 (*Martin y col., 2008*) y que, en otros sistemas, la inducción de NUR77 es dependiente de ERK1/2, nos interesó analizar la expresión de NUR77 y su dependencia con ERK1/2 en células de Leydig estimuladas con AMPc. Las células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante los tiempos indicados. Los niveles de NUR77 fueron analizados por PCR en tiempo real. La cinética de inducción de NUR77 mostró un incremento significativo (15 veces respecto al control) a partir del menor tiempo analizado (0,5 h). El efecto alcanza su valor máximo luego de 1 hora de estimulación, y luego empieza a decaer (Figura 31).

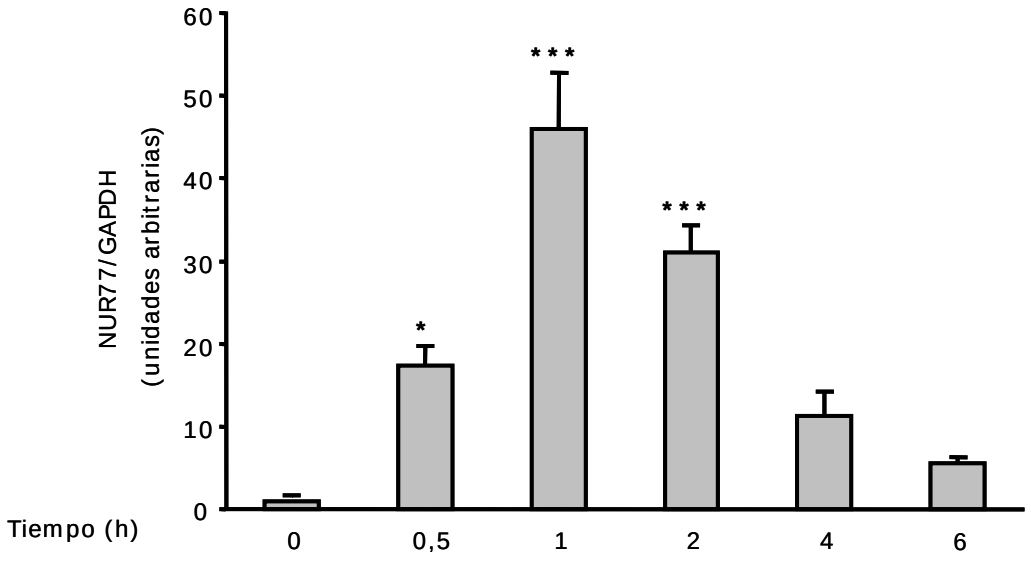


Figura 31. Aumento de los niveles de ARNm de NUR77 por 8Br-AMPc Las células fueron incubadas con 8Br-AMPc durante los tiempos indicados EL ARN total fue purificado y sometido a transcripción reversa con oligonucleótidos específicos para NUR77 y para GAPDH. El gráfico muestra la relación de intensidades NUR77/GAPDH en unidades arbitrarias. Los datos representan la media ± ES de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. *, P < 0,05; **, P < 0,01; *** P < 0,001 vs tiempo 0 de estimulación.

Luego se investigó la capacidad del AMPc de inducir la expresión de NUR77 en condiciones en las que se bloquea la activación de ERK1/2. Se evaluaron los niveles del ARNm correspondiente a NUR77 en células que se preincubaron con o sin el inhibidor PD98059 y luego se estimularon con 8Br-AMPc durante 1 hora, tiempo de máxima inducción.

El análisis por PCR en tiempo real mostró que el 8Br-AMPc incrementa los niveles del mensajero correspondiente a NUR77 y que el inhibidor PD98059 disminuye la magnitud de este efecto (Figura 32). Este hecho sugiere que el mecanismo por el cual el AMPc dispara la inducción de NUR77 involucra la actividad de ERK1/2.

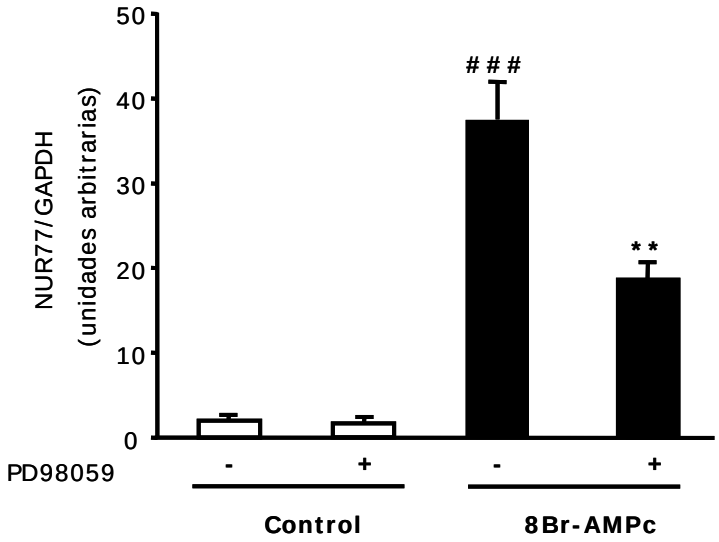


Figura 32. Efecto de ERK1/2 sobre los niveles del ARNm de NUR77 en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron privadas de suero durante 24 h, luego fueron estimuladas con 8BR-AMPc 0,5 mM durante 1 h, en presencia o ausencia PD98059 (50 µM). Los niveles de ARNm correspondientes a NUR77 y GAPDH (control) se analizaron por PCR en tiempo real. El gráfico muestra la relación de intensidades NUR77/GAPDH en unidades arbitrarias. Los datos representan la media ± ES de tres experimentos independientes. ###, P < 0,001 vs Control en ausencia de PD98059; **, P < 0,01 vs células estimuladas con 8Br-AMPc en ausencia de PD98059, por ANOVA seguido de test de Tukey.

Estos resultados sugieren que la inhibición que produce la expresión de MKP-1 sobre la inducción del gen STARD1 (*Brion y col, 2011)* se debería, al menos en parte, a la capacidad de la fosfatasa de reducir la actividad de ERK1/2 y consecuentemente, la inducción de NUR77.

El hecho de que el mensajero de NUR77 se incremente por acción del AMPc en forma dependiente de la actividad de ERK es compatible con resultados previos de nuestro laboratorio (*Laura Brion, Tesis Doctoral 2010*). En ese trabajo se demostró que el 8Br-AMPc incrementa la actividad del promotor NUR77 y que la sobreexpresión de MKP-1 reduce este efecto, mientras que el bloqueo de la expresión de MKP-1 tiene un efecto contrario. Por lo tanto, se infiere que la inducción de este factor de

transcripción se modificará por aquellos factores que modifiquen la inducción de MKP-1, como por ejemplo la fosforilación y consecuente estabilización.

En párrafos anteriores mostramos que las formas mutadas de MKP-1 en sitios de fosforilación por ERK específicos altera la estabilidad de la proteína. En particular, las quimeras flag-MKP-1 S359A-S364A y flag-MKP-1 S296A-S323A mostraron tener menor y mayor estabilidad respectivamente comparadas con flag-MKP-1 WT. Por lo tanto, pensamos que cada una de estas mutantes podría modificar la actividad del promotor de NUR77 de diferente manera.

A continuación evaluamos el efecto de la sobreexpresión de dichas quimeras sobre la actividad del promotor de NUR77. Las células MA-10 fueron co-transfectadas con los vectores pGL-3-NUR77 y pFLAG-MKP-1 WT o pFLAG-MKP-1-S359A-S364A o pFLAG-MKP-1-S296A-S323A o el vector vacío (*Mock*). Al día siguiente fueron privadas de suero por 24 horas y estimuladas luego con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 4 horas. Finalmente, fueron procesadas para la determinación de la actividad de luciferasa.

Los resultados mostraron que tanto la MKP-1 WT como la mutante en S296 y S323 disminuyen el efecto del AMPc sobre la actividad del promotor de NUR77. Sin embargo, la mutante en S359A-S364A no es capaz de producir este efecto. Este resultado es congruente con el hecho de que la forma mutada S296A-S323A posee mayor tiempo de vida media que la forma WT; mientras que la mutante S359A-S364A es degradada más rápidamente que la WT. (Figura 33)

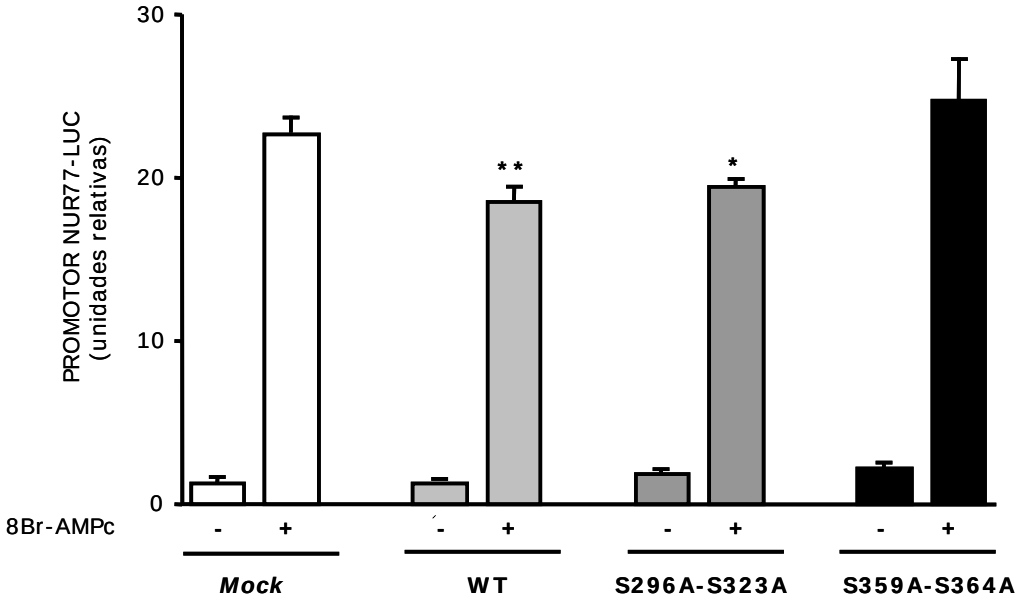


Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de MKP-3 sobre la actividad del promotor de NUR77. Células MA-10 fueron transfectadas con los plásmidos pFLAG-MKP1 WT, pFLAG-MKP-1-S296A-S323A, pFLAG-MKP-1-S359A-S364A o con el vector vacío (*Mock*) junto con el plásmido pGL3-NUR77. Luego las células fueron privadas de suero por 24 h y estimuladas con 8Br-AMPc 0,5 mM durante 4 h. Se obtuvieron los lisados celulares y se midió la actividad de luciferasa. Cada valor fue normalizado respecto de la actividad de luciferasa de *Renilla*. Los datos expresan la media ± ES de tres experimentos independientes. **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$ vs Células *Mock* estimuladas con 8Br-AMPc.

En síntesis, los resultados presentados demuestran que, como se observa en otros sistemas, la expresión del factor de transcripción NUR77 es dependiente de la actividad de ERK y por lo tanto, es susceptible a la modulación por MKP-1. Incluso los factores que pueden promover la inducción o degradación de MKP-1 impactan en la expresión de NUR77.

Conclusiones y Discusión

I. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE MKP-3 EN CÉLULAS DE LEYDIG

En este trabajo se han analizado aspectos regulatorios y funcionales de la MAPK fosfatasa MKP-3 en células de Leydig bajo el estímulo de GC (hCG), hormona que activa al receptor de LH (RLH). El presente estudio pone en evidencia, por primera vez, que la activación del RLH regula la expresión de MKP-3, una enzima citoplasmática que se induce exclusivamente por estímulos proliferativos. En concordancia con estos hallazgos, se demostró que la activación del RLH conduce a la inducción de p21, un inhibidor de la proliferación, y que la expresión de MKP-3 participa en este proceso.

Es conocido que la proliferación y la diferenciación de las células de Leydig fetales son independientes de LH (*Christensen y Peacock KC, 1980; Teerds y col., 1988*). Sin embargo, la proliferación y la diferenciación de las células de Leydig postnatales son altamente dependientes de LH. Por ejemplo, ratones con bajos niveles de LH o con RLH no funcionales presentan hipoplasia de células de Leydig, hipoandrogenismo e infertilidad (*Zhang y col., 2001, Lei y col., 2001; O´ Shaughnessy y col., 1998*). Esta capacidad de LH para estimular la proliferación y la diferenciación de células de Leydig y para inducir hiperplasia de este tipo celular en roedores se conoce desde hace muchos años (*Christensen y Peacock KC, 1980; Teerds y col., 1988*). Todos estos datos permitieron postular que la activación del RLH activa cascadas de señalización que promueven la proliferación de las células de Leydig.

Aunque el AMPc es el mediador más importante de las acciones de LH (*Ascoli y col., 2002*), las vías de transducción de señales que median la acción de esta hormona sobre la proliferación y diferenciación de la población postnatal de células de Leydig se comenzaron a dilucidar más recientemente. Actualmente está bien documentado que una de las consecuencias de la activación del RLH en células de Leydig es la activación del eje MEK1/2-ERK1/2 (*Shiraishi y Ascoli, 2007*). Se conoce además que ERK1/2 participa tanto en la regulación de la síntesis de esteroides (*Gyles y col., 2001*), como en la proliferación y/o la supervivencia de las células de Leydig (*Shiraishi y Ascoli, 2007*). Mucho más recientemente se ha demostrado que la activación del RLH promueve la expresión de miembros de la familia de las MKPs. En particular, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que, en células de Leydig MA-10, la estimulación del RLH provoca la inducción de las isoformas nucleares MKP-1 y MKP-2 (*Brion y col., 2011, Gómez y col., 2013*), enzimas que se inducen por

diferentes tipos de estímulos y que desfosforilan a los miembros de los tres subgrupos de MAPKs. El presente trabajo demuestra, por primera vez, que la activación del RLH regula también la expresión de la isoforma MKP-3.

MKP-3, producto del gen DUSP6, es una enzima citoplásmica inducida por diferentes estímulos proliferativos pero no por otro tipo de estímulos como el estrés ambiental. Además MKP-3 está descripta como una fosfatasa altamente específica para la atenuación de la señalización de la quinasa ERK1/2 (*Zhao y Zhang, 2001*). En concordancia con estos conceptos, ratones con expresión deficiente de MKP-3 presentan una mayor fosforilación basal de ERK1/2 (*Maillet y col., 2008*). El ARNm de MKP-3 exhibe una expresión tisular diferencial y diferentes estímulos proliferativos incrementan los niveles de este mensajero (*Muda y col., 1996; Camps y col., 2000*). En este trabajo demostramos que, en células de Leydig MA-10, el nivel basal del ARNm de MKP-3 es bajo pero detectable y que LH/hCG produce un aumento transitorio del mismo. El 8Br-AMPc, un derivado permeable del segundo mensajero de la acción hormonal, produce un efecto cuantitativamente similar y con el mismo curso temporal que la hormona. Aquí demostramos que la hormona y el AMPc producen un aumento significativo del mensajero luego de tiempos cortos de estimulación (2 horas). Numerosos trabajos muestran que la cinética de inducción de MKP-3 varía ampliamente en los diferentes sistemas. Así por ejemplo en células PC12 (derivadas de un feocromocitoma de médula adrenal de rata), la estimulación con NGF incrementa el mensajero de MKP-3 a partir de la hora de estimulación (efecto máximo a las 3 horas) (*Camps y col, 1998*). Similar resultado se observó en células de la línea rH-*ras*MCF10A, células de epitelio mamario humano que sobreexpresan RAS, bajo estimulación con el éster de forbol TPA o con EGF (*Zeliadt y col., 2008*). En ciertos casos la inducción de MKP-3 se detecta sólo después de un tiempo prolongado de exposición al estímulo (>12 horas), en particular en células de la granulosa indiferenciadas la estimulación con TGFα provoca la inducción de MKP-5 a las 3 horas y luego de 20 horas, provoca la inducción de MKP-3 (*Woods y Johnson, 2006*). Por otro lado, en ciertos tipos celulares MKP-3 se expresa constitutivamente, como por ejemplo en fibroblastos (*Dowd y col., 1998*). Tales discrepancias pueden deberse a diferencias en la expresión de la maquinaria transcripcional y la operatividad de las redes de señalización en los distintos tipos celulares.

Hemos demostrado que el aumento del ARNm de MKP-3 por hCG/AMPc es disminuido por la presencia del inhibidor de la transcripción actinomicina D. Por ello

inferimos que la acumulación del mensajero promovida por el estímulo hormonal es consecuencia de la activación génica. En otros sistemas el aumento del mensajero resulta, al menos en parte, consecuencia de su estabilización. Por ejemplo, se ha demostrado que en condiciones de hipoxia el ARNm de MKP-3 se acumula como consecuencia de un mecanismo de regulación post-transcripcional dependiente de ERK1/2. (*Bermudez y col., 2011*). Por otro lado, también se ha demostrado la desestabilización del mensajero, en particular el óxido nítrico provoca este efecto (*Rössig y col., 2000*). En nuestro sistema, hCG y 8Br-AMPc regulan los niveles del mensajero de MKP-3 sin cambios en la vida media del mismo y por una acción a nivel transcripcional con la participación de la vía MEK/ERK. Al respecto se ha descrito la presencia en la región promotora de MKP-3 de un sitio conservado de unión a los reguladores de la transcripción de la familia de los Ets (*E twenty-six*), factores que son blanco de acción de ERK1/2 (*Ekerot y col., 2008*). En particular la regulación de la expresión de MKP-3 por FGF involucra la unión de Et2 a la región promotora del gen (*Ekerot y col., 2008*).

En células de Leydig MA-10, la inhibición de MEK con PD98059 reduce el efecto del AMPc sobre los niveles del ARNm de MKP-3. Sin embargo, la reducción sólo alcanza al 50%, lo que significa que eventos dependientes de PKA –e independientes de ERK1/2– también tendrían una contribución en la inducción de la expresión del gen.

Utilizando un anticuerpo dirigido contra la forma humana de MKP-3, altamente homóloga a la forma murina, analizamos la proteína MKP-3 por Western blot y por inmunocitoquímica. El análisis por inmunocitoquímica mostró una señal débil en células controles que se intensificó significativamente luego de las 2 horas de estimulación con 8Br-AMPc y continuó elevada hasta las 6 horas. La señal fue detectada tanto en el citoplasma como en el núcleo, aun cuando MKP-3 se considera una proteína citosólica. Por otro lado, mediante Western blot, se detectó un aumento de la proteína endógena respecto de los niveles controles, aunque los ensayos requirieron mayores cantidades de proteínas totales que las utilizadas habitualmente.

La exportación nuclear de ciertas proteínas está mediada por los receptores de transporte o exportinas. La exportina-1 (o CRM1) interactúa directamente con un motivo rico en leucina en diferentes proteínas o motivo NES. Se ha descrito que este sistema de exclusión nuclear funciona en la localización citoplasmática de MKP-3.

Más aún, este motivo NES es conservado entre las tres isoformas de MKPs citosólicas (MKP-3, MKP-4 y MKP-x). La exclusión nuclear mediada por NES de MKP-3 opera en combinación con un proceso activo de importación al núcleo, aunque bajo el estado estacionario predomina la exclusión nuclear lo que resulta en una localización preponderantemente citosólica de la proteína (*Karlsson y col., 2004*).

Mediante ensayos *in vitro* se determinó que la secuencia NES de MKP-3 (comprendida entre los aminoácidos 161-175) facilita la unión entre esta proteína y ERK2 (*Zhou y col., 2001)*. Si bien la secuencia que permite la interacción específica de ERK1/2 reside en el dominio MKB principalmente, Zhou y colaboradores han demostrado que NES es un punto adicional de interacción de la enzima con su sustrato. Esta doble función de la secuencia NES (exportación nuclear y unión a ERK1/2), permite anclar a ERK1/2 en el citoplasma en condiciones basales. Por otra parte, se ha descrito que, si bien MKP-3 se une preferentemente a su sustrato fosforilado, la enzima es capaz de unir también al sustrato desfosforilado aunque con menor afinidad (Kd ERK2/MKP-3= 190 nM; Kd P-ERK2/MKP-3= 30 nM), lo cual contribuye a la relocalización citoplasmática de ERK1/2 (*Caunt y Keyse, 2013).* Finalmente, dado que la exportación nuclear depende de los receptores de transporte, la abundancia relativa de MKP-3 y de estos receptores puede explicar una mayor o menor localización en el núcleo de una proteína citoplasmática como MKP-3 (*Poon y Jans, 2005*).

Una de las primeras características descritas de MKP-1 fue la fosforilación por ERK en sitios conservados, modificación que impide la degradación de la proteína y que, por la tanto, incrementa la vida media de la misma *(Boutros, 2008*). La fosforilación de MKP-3 por ERK1/2 también ha sido descrita, sin embargo los trabajos publicados al respecto muestran que la estabilidad de MKP-3 se reduce cuando dicha proteína es fosforilada por ERK1/2. Marchetti y colaboradores demostraron que en fibroblastos expuestos a suero, MKP-3 se encuentra fosforilada en dos residuos de serina (S159 y S197) y que esta modificación reduce la estabilidad de MKP-3 debido a una mayor degradación de la proteína por el proteosoma (*Marchetti y col., 2005*). Los resultados de experimentos obtenidos en líneas celulares que sobreexpresan RAS permitieron llegar a similar conclusión ya que demostraron que la estimulación de ERK1/2 provoca la pérdida de MKP-3 dentro de los 30 minutos por una disminución de la estabilidad de la proteína (*Zeliadt y col., 2008*). En hepatocitos también se ha observado la fosforilación y degradación de MKP-3, en este caso por tratamiento con

insulina (*Feng y col., 2012*). Este efecto es la consecuencia de la fosforilación de la proteína en los residuos de S159 y S197 (*Feng y col., 2012*).

Si comparamos los diagramas que muestran las estructuras de MKP-1 y MKP-3 (Figura 4), observamos que la fosforilación mediada por ERK1/2 en ambas enzimas ocurre en diferentes dominios. En MKP-1 las fosforilaciones por ERK1/2 ocurren en el dominio carboxilo terminal, en sitios que impiden la ubiquitinación y degradación (S354 y S359) y en sitios donde reclutan a la ubiquitina ligasa SCK^{skp2} que favorece la degradación por el proteosoma (S296 y S323). Por el contrario, en MKP-3 los sitios de fosforilación por ERK1/2 están localizados en el interdominio que contiene la secuencia NES. Esto nos lleva a preguntarnos acerca del mecanismo que determina la degradación de MKP-3 luego de la fosforilación en dicho interdominio. En la mayoría de las MKPs, la unión del sustrato al sitio MKB provoca un cambio conformacional que favorece un acercamiento entre el sustrato y el sitio catalítico, lo cual lleva a un aumento de la actividad enzimática. Es posible que ese cambio conformacional favorezca el reconocimiento de la forma fosforilada de MKP-3 por los componentes del sistema de degradación del proteosoma (*Caunt y Keyse, 2013*).

Los antecedentes mencionados con respecto a la regulación post-traduccional de MKP-3 nos llevaron a analizar si este mecanismo podría observarse también en nuestro modelo experimental. Los resultados obtenidos sugieren que la estimulación de las células MA-10 con hCG u 8Br-AMPc conduce a la estabilización de MKP-3, contrariamente a lo esperado según la bibliografía. Cabe mencionar que el análisis de la secuencia de la proteína MKP-3 muestra la presencia de varios sitios consenso para la fosforilación por diferentes quinasas. Se ha postulado que en fibroblastos, la inducción con suero, que lleva a la fosforilación de MKP-3 por ERK1/2 y a su degradación por el proteosoma, no excluye la potencial participación de otras cascadas de señalización (*Marchetti y col., 2005*). Esto se explica por el hecho de que la inhibición de MEK solo confiere protección parcial a la degradación de MKP-3 (*Marchetti y col., 2005*). Ante este panorama es posible plantear que, en células MA-10, la estabilización de MKP-3 promovida por hCG/AMPc involucra la fosforilación por otras quinasas diferentes a ERK1/2 o incluso, a otro tipo de modificaciones covalentes. Esta posibilidad está sustentada, además, por el hecho de que en nuestros experimentos no logramos reducir la estabilidad de MKP-3 inducida por hCG/AMPc mediante la preincubación de las células con el inhibidor de ERK1/2 PD98059 (datos no mostrados). En este contexto debe mencionarse que la treonina

92 presente en la secuencia de MKP-3 humana corresponde a un sitio de fosforilación por PKA de alto "*score*" (NetPhosK 1.0). Por lo tanto, podría postularse que la estabilidad de MKP-3 inducida por hCG/AMPc involucra la fosforilación mediada por PKA en ese sitio

En este trabajo concluimos que la activación del RLH promueve la inducción de MKP-3 por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales. Este hallazgo nos planteó un nuevo desafío: determinar el papel funcional de esta enzima en el contexto de la célula de Leydig. En este trabajo hemos recurrido a la sobreexpresión de MKP-3 y al bloqueo de la expresión de la proteína endógena para analizar, en primer lugar, el impacto de MKP-3 sobre el grado de fosforilación de ERK1/2. Al analizar el efecto de la sobreexpresión de MKP-3 hemos observado una disminución en la fosforilación de ERK1/2, (efecto más notable a los 20 y 60 minutos de estimulación). Por otro lado, el bloqueo de le expresión de la proteína endógena produce un incremento de las formas fosforiladas de ERK1/2 evidente a los 20 minutos y que perdura aún hasta los 120 minutos. Estos resultados confirman que la inducción de MKP-3 impacta en la fosforilación de ERK1/2

Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que, en células MA-10, hCG y AMPc promueven la inducción y acumulación de MKP-1 y MKP-2 en el núcleo luego de 30 minutos (*Brion y col., 2011*) y 60 minutos de estimulación (*Gómez y col, 2013*) respectivamente. Esta acción coordinada en el tiempo contribuye a la completa desfosforilación de ERK1/2 en el núcleo luego de 180 minutos de estimulación. Así, la inducción de MKP-1 se refleja en una brusca caída de los niveles de P-ERK1/2 entre los 10 y 20 minutos de estimulación (*Brion y col., 2011*) mientras que la acción de MKP-2 se refleja en la caída final de los niveles de P-ERK1/2, entre los 120 y 180 min de estimulación (*Gómez y col., 2013*). Teniendo en cuenta que la inducción de StAR es un evento dependiente de ERK1/2 (evento de ocurrencia temprana en el marco temporal de estimulación hormonal de las células de Leydig), se analizó la dependencia entre MKP-1 y la expresión de StAR y se comprobó que la inducción de MKP-1 reduce la acción hormonal sobre la expresión de StAR (*Brion y col., 2011*). Ascoli y colaboradores demostraron que la cantidad de progesterona (P4) acumulada en el medio de cultivo de las células MA-10 por acción de LH/hCG es máxima a las 6 horas, aunque la velocidad de acumulación comienza a disminuir a partir de las 3 y 4 horas de estimulación (*Ascoli y col., 1987*). Entendemos que la inducción de MKP-1 es un evento determinante de ese cambio en

la velocidad de producción de P4 por su acción en la desfosforilación temprana de ERK1/2 y consecuente disminución en la síntesis de StAR. La inducción de MKP-2 repercute en la fosforilación de ERK1/2, pero su acción se manifiesta más tardíamente. Por lo tanto, se planteó como poco probable que la acción de MKP-2 sobre ERK1/2 tuviera efecto sobre la expresión de genes dependientes de ERK1/2 y de cinética de expresión rápida. Se demostró que MKP-2 interfiere con la inducción del gen CYP11A1, que codifica para una enzima esteroidogénica que forma parte de los genes de inducción de la fase crónica de estimulación (*Gómez y col., 2013*).

En el marco de los antecedentes planteados, la búsqueda de un blanco para la inducción de MKP-3 fue un desafío. Postulamos que el papel principal de MKP-3 en nuestro sistema implicaría la regulación de una función de LH diferente a la regulación aguda de la síntesis de esteroides. Pensamos que la inducción de esta enzima podría atenuar la acción de un estímulo mitogénico, en base a dos propiedades de MKP-3: su especificidad por ERK1/2 y su inducción por estímulos proliferativos.

Un número acotado de trabajos demuestran la acción de MKPs sobre sustratos que no son miembros de la familia de las MAPKs. Por ejemplo, MKP-1 es capaz de desfosforilar a STAT1 (*Signal Transducer and activators of transcription*) (*Venema y col., 1998*) y a la Histona H3 (*Kinney y col., 2009*). Por otro lado, como ya hemos mencionado, se demostró que la expresión de MKP-3 se asocia con la desfosforilación de FOXO1, su translocación al núcleo y su asociación con los promotores de genes que codifican para enzimas de la gluconeogénesis (*Wu y col., 2010*). Teniendo en cuenta estos trabajos pensamos que la acción de MKP-3 en células de Leydig estimuladas con hCG/AMPc podría involucrar la desfosforilación de FOXO1. En caso de ser así, podría observarse la activación transcripcional de genes dependientes de FOXO1.

La expresión de p21 es un evento transcripcional dependiente de la activación FOXO1 (*Roy y col., 2010.*). Por otro lado, la translocación de FOXO1 al núcleo requiere la desfosforilación en sitios regulatorios (*Jiao y col., 2012; Wu y col., 2010).* Si bien esta desfosforilación y la inducción de p21 podían ser consecuencia de la inducción de MKP-3, desconocíamos si LH/hCG podía modular la expresión de p21. Aquí demostramos, por primera vez, que hCG y AMPc regulan los niveles del ARNm correspondiente a p21. El AMPc provoca un incremento significativo luego de 2 horas de estimulación y, a partir de ese tiempo, los niveles del ARNm comienzan a

descender. Comprobamos que el bloqueo de la expresión de MKP-3 reduce el efecto del AMPc sobre los niveles del ARNm de p21, lo que sugiere que la fosfatasa contribuye a la expresión de p21. Este resultado sería compatible con un modelo donde la estimulación hormonal induce la proliferación de las células de Leydig durante un corto período, ya que a las 2 horas de estimulación los niveles de p21 se han elevado como para frenar este efecto

En síntesis, nuestros resultados muestran que la activación RLH aumenta los niveles del ARm de p21 y que este efecto es el regulado por la MKP-3. Aunque el mecanismo implicado en la regulación de la expresión de p21 por MKP-3 sigue aún sin dilucidar, es posible plantear un modelo hipotético en el cual LH/hCG desencadena la activación de ERK1/2 y la proliferación de las células de Leydig y, en una etapa posterior, induce la expresión de MKP-3. A su vez, la fosfatasa promovería la desfosforilación de ERK1/2 y la inducción de p21, actuando así como un regulador negativo de la proliferación celular.

La figura 34 muestra un esquema que resume la regulación de MKP-3 por LH/hCG y su papel funcional en las células de Leydig. Sin embargo, es necesario confirmar la modulación de la fosforilación de FOXO1 por estimulación del RLH y el efecto de MKP-3 en la desfosforilación de este factor, lo cual contribuiría a afianzar el modelo propuesto. Los resultados preliminares muestran que efectivamente los niveles de la forma fosforilada de FOXO1 se modifican con el estímulo de 8Br-AMPc. Sin embargo, aún queda por demostrar la interacción de FOXO1 con MKP-3 y la correlación temporal entre la inducción de MKP-3 por hCG/AMPc, desfosforilación de FOXO1, la expresión de p21 y la proliferación celular.

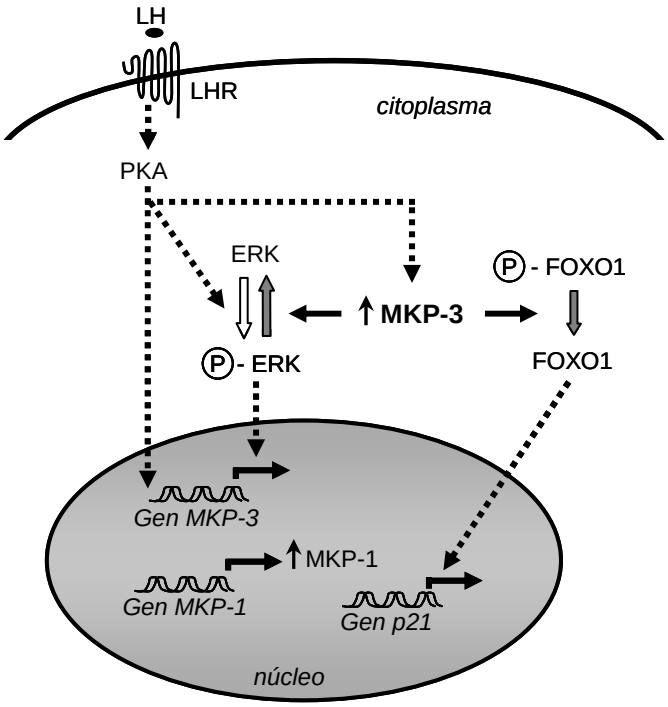


FIGURA 34. Modelo propuesto para la regulación de MKP-3 por LH/hCG y su papel funcional en las células de Leydig MA-10. LH se une a su receptor, activando a PKA, lo cual provoca la rápida fosforilación de ERK1/2. La forma activada de ERK (P-ERK) transloca al núcleo donde, junto con PKA promueve la expresión de MKP-1. MKP-1 permanece en el núcleo donde desfosforila a P-ERK. PKA y P-ERK promueven la expresión de MKP-3, la cual se acumula en el citoplasma donde desfosforila a ERK y a P-FOXO1. FOXO1 transloca al núcleo y regula la expresión de p21. Los efectos directos se muestran con líneas sólidas, mientras que los indirectos se representan mediante líneas punteadas.

II. CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE MKP-1 POR MÚLTIPLES FOSFORILACIONES: IMPACTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE NUR77

En este trabajo estudiamos, además, aspectos regulatorios de otra MKP, la MKP-1. Analizamos, en células de Leydig, si MKP-1 es fosforilada en los sitios S296 y S323 en respuesta a la estimulación con AMPc y la relevancia de esta modificación sobre la estabilidad de la proteína. Comprobamos que la mutante flag-MKP-1-S296A S323A tiene una vida media mayor que la forma WT, lo que sugiere que la fosforilación en estos sitios promueve la degradación de MKP-1, como demuestra el

trabajo de Lin y colaboradores basado mayormente en estudios *in vitro* (*Lin y Yang, 2006*). Por otra parte comprobamos que la vida media de la quimera flag-MKP-1-S359A S364A tiene una vida media mayor que la forma WT, lo que indica que la fosforilación en S359 y S364 confiere estabilidad a la proteína, como se demostró previamente (*Brondello y col., 1999*). Por lo tanto, se deduce que en células de Leydig, los cuatro sitios de fosforilación por ERK1/2 son determinantes de la estabilidad de MKP-1 y que la estimulación hormonal promueve un incremento en la vida media de la proteína (que resulta de la fosforilación en esos cuatro sitios). Este hallazgo resulta novedoso ya que, si bien en numerosos tipos celulares y bajo diferentes estímulos se ha comprobado el rol de la fosforilación en los sitios S359 y S364 sobre la estabilidad de la proteína (*Boutros y col., 2008*), la fosforilación en los sitios de inestabilidad bajo el estímulo de un determinado ligando y vía ERK1/2 esta mucho menos difundida.

Los cuatro sitios consenso de fosforilación por ERK mencionados están presentes también en otra MKP nuclear, la MKP-2. Además, tanto MKP-1 como MKP-2 presentan otros sitios de fosforilación, por ejemplo sitios de fosforilación para PKA y PKC, aunque la ocurrencia *in vivo* de tales modificaciones no está documentada. No obstante, Sewer y Waterman demostraron que MKP-1 puede ser fosforilada *in vitro* por la subunidad catalítica de PKA y que la estimulación de las células adrenocorticales humanas de la línea H295R con AMPc promueve la fosforilación de la MKP-1 endógena (*Sewer y Waterman, 2003*). Este estudio no se focalizó en el análisis de los sitios involucrados en la fosforilación *in vivo*, por lo tanto, no puede afirmarse que la fosforilación ocurra por acción directa de PKA sobre MKP-1, aunque ésta haya sido desencadenada por la estimulación con AMPc. Por otra parte, en células de Leydig MA-10 la estabilización de MKP-2 por hCG y 8Br-AMPc ocurre por un mecanismo independiente de ERK1/2 (*Gómez y col., 2013*), lo cual sugiere que la estabilización ocurre por una fosforilación directa por acción de PKA. En línea con esta hipótesis, el análisis de la secuencia de MKP-2 (NetPhosK 1.0) demostró que de los posibles sitios de fosforilación, el de mayor probabilidad corresponde a la fosforilación por PKA en S319.

Por otro lado, el análisis de la secuencia aminoacídica de MKP-1 y MKP-2 revela sitios conservados para diversas modificaciones post-traduccionales. Además de los sitios de fosforilación por distintas quinasas, presentan sitios consenso para otro tipo de modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo acetilación y

SUMOilación. De estas dos modificaciones, sólo la acetilación ha sido observada en un sistema *in vivo*. En particular, se demostró que en macrófagos expuestos a lipopolisacáridos se produce la acetilación de MKP-1. Esta modificación ocurre en el sitio L57 y parece modular la interacción de MKP-1 con p38 (*Cao y col., 2008*). El aminoácido L57 corresponde al sitio L82 en MKP-2, por lo tanto la existencia de sitios conservados de acetilación en las MKPs podría indicar que esta modificación tuviera cierta repercusión sobre la acción biológica de las mismas.

Una pregunta que nos hemos planteado se refiere al posible efecto de la fosforilación por diferentes quinasas, de la acetilación y/o de la SUMOilación sobre las propiedades de MKP-1/MKP-2 y consecuentemente, sobre el efecto biológico de las mismas. Resulta interesante que ciertas modificaciones post-traduccionales regulan la localización subcelular de proteínas. Por ejemplo, la acetilación de Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) en el dominio NLS provoca la retención de la misma en el citoplasma (*Inuzuka y col., 2012*). Esta localización subcelular específica de Skp2 facilita la ubiquitinación de la proteína E-caderina lo cual aumenta la migración celular (*Inuzuka y col., 2012*). Estos antecedentes sugieren que la acetilación puede ser importante para la localización subcelular. Incluso se ha descripto que la SUMOilación puede regular la localización de una proteína en un compartimento deteminado (*Truong y col., 2012*).

Aunque el análisis *in silico* indica que las MKPs son susceptibles a diversas modificaciones covalentes, sólo se ha documentado un cambio en la vida media por fosforilación, aunque podemos decir que, según nuestros resultados preliminares, la acetilación de MKP-1 podría estabilizar a la proteína, sin descartar una acción sobre la localización subcelular. Hemos determinado que cuando las células MA-10 se incuban con Tricostatina A (un inhibidor de histona deacetilasa), se produce la acumulación de la quimera flag-MKP-1 (*Mori Sequeiros Garcia y col., 2011*).

Todo lo expuesto sobre la regulación post-traduccional de MKP-1 y MKP-2 podría impactar sobre su acción biológica en células de Leydig. Por este motivo, hemos analizado si un cambio en la estabilidad de MKP-1 interfiere con el efecto hormonal sobre la esteroidogénesis. En particular el objetivo de este trabajo se centró en la expresión de un factor de transcripción requerido para la inducción del gen STARD1, NUR77.

El gen NUR77 (NR4A1), que codifica para el receptor nuclear huérfano NUR77, es un gen de respuesta temprana cuya expresión es inducida rápidamente por una variedad de estímulos fisiológicos. NUR77 se expresa en varios órganos, incluyendo las gónadas y las glándulas suprarrenales (*Maxwell y Muscat, 2005*). NUR77 tiene un rol clave en la expresión de varios genes involucrados en la inflamación, la esteroidogénesis, diferenciación sexual masculina y en la función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal e hipotálamo-hipófisis-gonadal. Entre estos genes, y teniendo en cuenta el modelo experimental de este trabajo, podemos citar los genes CYP17 a1 (*Zhang y Mellon, 1997*), STARD1 (*Martin y Tremblay, 2008; Martin y col., 2008*), CYP21a1 (*Wilson y col., 1993*); HSD3B2 (*Bassett y col., 2004*).

Se ha investigado acerca del mecanismo de regulación de la expresión de NUR77 y su participación en la inducción de StAR en células de Leydig MA-10 (*Martin y col., 2008 y 2009*). De estos trabajos se concluye que la inducción de NUR77 por AMPc precede la inducción de StAR e involucra la actividad de la quinasa CAMKI pero no requiere la actividad de ERK1/2. Este resultado contradice lo observado en otros sistemas, por ejemplo en gonadotrofos, GnRH estimula la expresión de NUR77 por un mecanismo dependiente de PKC y ERK1/2 (*Bliss y col., 2012*). Esta dependencia con la actividad de ERK se observó en otros sistemas, tales como en el cerebro bajo estimulación con dopamina (*Bourhis y col, 2008*), en fibroblastos estimulados con EGF, PMA y TNF (*Darragah y col., 2005*) y en corticotrofos AtT20 estimulados con AMPc (*Kovalovsky y col., 2002*).

Nuestro grupo ha demostrado que la sobreexpresión de flag-MKP-1 reduce la actividad del promotor de NUR77 inducida por 8Br-AMPc (*Brion, 2010*). Esto nos llevo a estudiar más profundamente el rol de ERK1/2 en la inducción de NUR77. Determinamos que, en células MA-10, el bloqueo de la activación de ERK1/2 reduce el efecto del 8Br-AMPc sobre los niveles del ARNm de NUR77. Estos hallazgos muestran un nuevo blanco en la acción de MKP-1: el control de la expresión de un factor de transcripción necesario para la inducción de StAR.

Con los resultados precedentes, decidimos analizar si los cambios en la estabilidad de MKP-1, inducidos por la fosforilación dependiente de ERK1/2, afectan el nivel de expresión de NUR77. Como habíamos propuesto, los cambios en la estabilidad de MKP-1 repercuten en el nivel de expresión de NUR77. Mientras que la MKP-1 WT y la forma mutada en S296 y S323 reducen el efecto estimulatorio de AMPc sobre la expresión de NUR77, la mutante flag-MKP-1-S359A S364A -que posee

tiempo de vida media más corto que la WT- no produce este efecto; comportándose igual que el plásmido vacío (control). Por lo tanto, concluimos que en nuestro sistema, la expresión de NUR77 está bajo el control de la actividad de ERK.

En síntesis, en este trabajo demostramos que, en células de Leydig MA-10, el grado de fosforilación de ERK1/2 está estrictamente controlado por LH/hCG mediante la regulación de MKPs de localización nuclear y citoplasmática. A nivel nuclear, demostramos que la hormona promueve la fosforilación de MKP-1 por ERK1/2 en varios sitios, lo cual determina la estabilidad de la misma y por ende, la capacidad de ejercer su acción regulatoria sobre la estimulación de la esteroidogénesis. Aquí concluimos que en células MA-10, ERK1/2 participa en la activación del gen NUR77 por activación del RLH, y en línea con este hallazgo, que el grado de inducción de MKP-1 se refleja en una acción moduladora sobre dicho factor de transcripción. Demostramos también que la acción hormonal promueve la inducción de MKP-3 por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales y que este evento contribuye al control de la proliferación de la célula de Leydig. Probamos que LH/hCG y AMPc incrementan la expresión del inhibidor de la proliferación p21 mediante un mecanismo que involucra la participación de MKP-3. Nuestros trabajos futuros están orientados a demostrar la interacción de MKP-3 con FOXO1 y la participación de MKP-3 en la inducción de p21 en otros sistemas así como su impacto en la proliferación celular.

Parte de los resultados de esta tesis doctoral dieron origen a la siguiente publicación:

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.

Mori Sequeiros García M, Gómez NV, Gorostizaga A, Acquier A, González-Calvar SI, Mendez CF, Paz C.

Molecular and Cellular Endocrinology. 2013 May 22;371(1-2):174-81

Bibliografía

Aaronson, S.A., Rubin, J.S., Finch, P.W., Wong, J., Marchese, C., Falco, J., Taylor, W.G., Kraus, M.H., Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. Am Rev Respir Dis, 1990. 142 (6 Pt 2): p. S7-10.

Abdou, Villeneuve and Tremblay The Calcium Signaling Pathway Regulates Leydig Cell Steroidogenesis through a Transcriptional Cascade Involving the Nuclear Receptor NR4A1 and the Steroidogenic Acute Regulatory Protein. Endocrinology. 2013 Jan; 154(1):511-20.

Abraham, E., Alterations in cell signaling in sepsis. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 7: p.S459-464.

Arriola, D.J., Mayo, S.L., Skarra, D.V., Benson, C.A., Thackray, V.G., 2012. FOXO1 inhibits transcription of luteinizing hormone beta in pituitary gonadotrope cells. Journal of Biological Chemistry 287, 33424–33435.

Artemenko, I.P., Zhao, D., Hales, D.B., Hales, K.H., Jefcoate, C.R., Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. J Biol Chem, 2001. 276 (49): p. 46583-46596.

Ascoli M, Euffa J, Segaloff DL. Epidermal growth factor activates steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells without affecting the levels of cAMP and potentiates the activation of steroid biosynthesis by choriogonadotropin and cAMP. J Biol Chem. 1987 Jul 5;262(19):9196-203.

Ascoli, M., Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells:gonadotropin receptors and steroidogenic responses. Endocrinology, 1981. 108 (1): p.88-95

Ascoli, M., Fanelli, F., Segaloff, D.L., The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. Endocr Rev, 2002. 23 (2): p. 141-174.

Ashwell, J.D., The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. Nat Rev Immunol, 2006. 6 (7): p. 532-540.

Baker PJ, O'Shaughnessy PJ. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. Reproduction. 2001 Aug;122(2):227-34.

Barford, D., Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. Trends Biochem Sci, 1996. 21 (11): p. 407-412.

Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, De Vries CJ, Jimenez PT, Carr BR, Rainey WE. The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Implications for the control of adrenal functional zonation. J Biol Chem. 2004;279:37622–37630

Bermudez, O., Jouandin, P., Rottier, J., Bourcier, C., Pages, G., Gimond, C., 2011. Posttranscriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. Journal of Cellular Physiology 226, 276–284.

Bey, P., Gorostizaga, A.B., Maloberti, P.M., Lozano, R.C., Poderoso, C., Maciel, F.C., Podesta, E.J., Paz, C., Adrenocorticotropin induces mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. Endocrinology, 2003. 144 (4): p. 1399-1406.

Bilwes, A.M., den Hertog, J., Hunter, T., Noel, J.P., Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. Nature, 1996. 382 (6591): p. 555-559.

Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Miller A, Baccarini M, Roberson MS. ERK ignaling, but not c-Raf, is required for gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-induced regulation of Nur77 in pituitary gonadotropes. Endocrinology. 2012 Feb;153(2):700-11. doi: 10.1210/en.2011-0247. Epub 2011 Dec 20.

Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature. 2001. 411(6835):355-65.

Bork, P., Margolis, B., A phosphotyrosine interaction domain. Cell, 1995. 80 (5): p. 693-694.

Bose, H.S., Sugawara, T., Strauss, J.F., 3rd, Miller, W.L., The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. International Congenital Lipoid AdrenalHyperplasia Consortium. N Engl J Med, 1996. 335 (25): p. 1870-1878.

Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D., ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. Cell, 1991. 65 (4): p. 663-675.

Bourhis E, Maheux J, Rouillard C, Lévesque D.Extracellular signal-regulated kinases (ERK) and protein kinase C (PKC) activities are involved in the modulation of Nur77 and Nor-1 expression by dopaminergic drugs. J Neurochem. 2008. 106(2):875-88

Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. Pharmacol Rev. 2008 Sep; 60(3):261-310. doi: 10.1124/pr.107.00106.

Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-254.

Brion L, Maloberti PM, Gomez NV, Poderoso C, Gorostizaga AB, Mori Sequeiros Garcia MM, Acquier AB, Cooke M, Mendez CF, Podesta EJ, Paz C. Endocrinology, July 2011, 152(7):2665–2677

Brion L. Regulación hormonal y papel funcional de la MAP quinasa fosfatasa 1 (MKP-1) en cpelulas esteroidogénicas. Tesis de doctorado presentada en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

Brondello, J.M., Brunet, A., Pouyssegur, J., McKenzie, F.R., The dual specificity mitogen activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. J Biol Chem. 1997. 272 (2): p. 1368-1376.

Brondello, J.M., Pouyssegur, J., McKenzie, F.R., Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. Science, 1999. 286 (5449): p. 2514-2517.

Camps M, Chabert C, Muda M, Boschert U, Gillieron C, Arkinstall S. Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. FEBS Letter. 1998. 27;425(2):271-6.

Camps, M., Nichols, A., Arkinstall, S., Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. FASEB J. 2000. 14 (1): p. 6-16.

Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., Arkinstall, S., Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. Science. 1998. 280 (5367): p. 1262-1265.

Cao, W., Bao, C., Padalko, E., Lowenstein, C.J., Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. J Exp Med. 2008. 205 (6):p.1491-1503.

Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. Steroids. 2013 Feb;78(2):127-36.

Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., Parker, K.L., Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94 (21): p. 11540-11545.

Carraway, K.L., 3rd, Sliwkowski, M.X., Akita, R., Platko, J.V., Guy, P.M., Nuijens, A., Diamonti, A.J., Vandlen, R.L., Cantley, L.C., Cerione, R.A., The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. J Biol Chem, 1994. 269 (19): p. 14303-14306.

Casal, A.J., Ryser, S., Capponi, A.M., Wang-Buholzer, C.F., Angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression in bovine adrenal glomerulosa cells: implications in mineralocorticoid biosynthesis. Endocrinology, 2007. 148 (11): p. 5573-5581.

Castelli, M., Camps, M., Gillieron, C., Leroy, D., Arkinstall, S., Rommel, C., Nichols, A., MAP kinase phosphatase 3 (MKP3) interacts with and is phosphorylated by protein kinase CK2alpha. J Biol Chem, 2004. 279 (43): p. 44731-44739.

Castilla, R., Gadaleta, M., Castillo, A.F., Duarte, A., Neuman, I., Paz, C., Cornejo Maciel, F., Podesta, E.J., New enzymes involved in the mechanism of action of epidermal growth factor in a clonal strain of Leydig tumor cells. Endocrinology, 2008. 149 (7): p. 3743-3752.

Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. FEBS J. 2013. 280(2):489-504.

Charbonneau, H., Tonks, N.K., 1002 protein phosphatases? Annu Rev Cell Biol, 1992. 8: p. 463-493.

Chi, H., Barry, S.P., Roth, R.J., Wu, J.J., Jones, E.A., Bennett, A.M., Flavell, R.A., Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103 (7): p. 2274-2279.

Choi, B.H., Hur, E.M., Lee, J.H., Jun, D.J., Kim, K.T., Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. J Cell Sci, 2006. 119 (Pt 7): p. 1329-1340.

Christensen AK, Peacock KC 1980 Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. Biol Reprod 22:383–391

Clark, A.R., MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids? J Endocrinol. 2003. 178 (1): p. 5-12.

Clark, B.J., Soo, S.C., Caron, K.M., Ikeda, Y., Parker, K.L., Stocco, D.M., Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. Mol Endocrinol. 1995. 9 (10): p. 1346-1355.

Clark, B.J., Stocco, D.M., Steroidogenic acute regulatory protein: the StAR still shines brightly. Mol Cell Endocrinol. 1997. 134 (1): p. 1-8.

Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., Stocco, D.M., The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). J Biol Chem. 1994. 269 (45): p. 28314-28322.

Cohen, P.T., Protein phosphatase 1--targeted in many directions. J Cell Sci. 2002. 115 (Pt 2): p. 241-256.

Cooke, B.A., Lindh, M.L., and Janszen, F.H., Correlation of protein kinase activation and testosterone production after stimulation of Leydig cells with luteinizing hormone. Biochem J. 1976. 160(3): p. 439-46.

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

Darragh J, Soloaga A, Beardmore VA, Wingate AD, Wiggin GR, Peggie M, Arthur JS. MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. Biochem J. 2005. 390(Pt 3):749-59.

Davis, I.J., Lau, L.F.. Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. Mol Cell Biol, 1994. 14 (5): p. 3469-3483.

Desclozeaux, M., Krylova, I.N., Horn, F., Fletterick, R.J., Ingraham, H.A., Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. Mol Cell Biol. 2002. 22 (20): p. 7193-7203.

Dickinson, R.J., Keyse, S.M., Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. J Cell Sci. 2006. 119 (Pt 22): p. 4607-4615.

Dorfman, R.I., Comments on the metabolism of steroid hormones. Cancer Res, 1957. 17(5): p. 535-6.

Dowd, S., Sneddon, A.A., Keyse, S.M., Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. J Cell Sci, 1998. 111 (Pt 22): p. 3389-3399.

Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, Owens DM, Keenan ID, Dickinson RJ, Storey KG, Keyse SM. 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. Biochem J. 2008 Jun 1;412(2):287-98.

Farooq, A., Plotnikova, O., Chaturvedi, G., Yan, S., Zeng, L., Zhang, Q., Zhou, M.M., Solution structure of the MAPK phosphatase PAC-1 catalytic domain. Insights into substrate-induced enzymatic activation of MKP. Structure, 2003. 11 (2): p. 155-164.

Fawcett, D.W., Gametogenesis in the male: prospects for its control. Symp Soc Dev Biol, 1975 (33): p. 25-53.

Feng B, Jiao P, Yang Z, Xu H. MEK/ERK pathway mediates insulin-promoted degradation of MKP-3 protein in liver cells. Mol Cell Endocrinol. 2012. 25; 361(1-2):116-23. doi: 10.1016/j.mce.2012.03.025. Epub 2012 Apr 12.

Franklin, C.C., Srikanth, S., Kraft, A.S., Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95 (6): p. 3014-3019.

Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. J Ovarian Res. 2009. 16; 2(1):17. doi: 10.1186/1757-2215-2-17.

Garton, A.J., Tonks, N.K., PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated byserine phosphorylation. Embo J, 1994. 13 (16): p. 3763-3771.

Gómez NV, Gorostizaga AB, Mori Sequeiros García MM, Brion L, Acquier A, González-Calvar SI, Méndez CF, Podestá EJ, Paz C. MAPK phosphatase-2 (MKP-2) is induced by hCG and plays a role in the regulation of CYP11A1 expression in MA-10 Leydig cells. Endocrinology. 2013. 154(4):1488-500

Groom, L.A., Sneddon, A.A., Alessi, D.R., Dowd, S., Keyse, S.M., Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. Embo J. 1996. 15 (14): p. 3621-3632.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., Davis, R.J., Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. Embo J. 1996. 15 (11): p. 2760-2770.

Gyles, S.L., Burns, C.J., Whitehouse, B.J., Sugden, D., Marsh, P.J., Persaud, S.J., Jones, P.M., ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. J Biol Chem, 2001. 276 (37): p. 34888-34895

Hammer, G.D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B.D., Simpson, K., Weigel, N.L., Ingraham, H.A., Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. Mol Cell, 1999. 3 (4): p. 521-526.

Havelock, J.C., Smith, A.L., Seely, J.B., Dooley, C.A., Rodgers, R.J., Rainey, W.E., Carr, B.R., The NGFI-B family of transcription factors regulates expression of 3betahydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the human ovary. Mol Hum Reprod, 2005. 11 (2): p. 79-85.

Hay N. Interplay between FOXO, TOR, and Akt. Biochim Biophys Acta. 2011 Nov;1813(11):1965-70

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

Hiroi, H., Christenson, L.K., Strauss, J.F., 3rd, Regulation of transcription of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: temporal and spatial changes in transcription factor binding and histone modification. Mol Cell Endocrinol, 2004. 215 (1-2): p. 119-126.

Huang, C.Y., Tan, T.H., 2012. DUSPs, to MAP kinases and beyond. Cell and Bioscience2, 24.

Inaoka, Y., Yazawa, T., Uesaka, M., Mizutani, T., Yamada, K., Miyamoto, K., Regulation of NGFI-B/Nur77 gene expression in the rat ovary and in leydig tumor cells MA-10. Mol Reprod Dev, 2008. 75 (5): p. 931-939.

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. Acetylation-dependent regulation of Skp2 function. Cell 2012150:179-193

Ip, Y.T., Davis, R.J., Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—from inflammation to development. Curr Opin Cell Biol, 1998. 10 (2): p. 205-219.

Jarnaess, E., Tasken, K., Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. Biochem Soc Trans, 2007. 35 (Pt 5): p. 931-937.

Jefcoate, C.R., DiBartolomeis, M.J., Williams, C.A., McNamara, B.C., ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. J Steroid Biochem, 1987. 27 (4-6): p.721-729.

Jiao, P., Feng, B., Xu, H., 2012. Mapping MKP-3/FOXO1 interaction and evaluating the effect on gluconeogenesis. PLoS ONE 7, e41168.

Karaboyas, G.C., Koritz, S.B., The Transformation of Delta-5-Pregnenolone and Progesterone to Cortisol by Rat Adrenal Slices and the Effect of Acth and Adenosine 3'-,5'-Monophosphate Upon It. Biochim Biophys Acta, 1965. 100: p. 600-602.

Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R.J., Mandl, M., Keyse, S.M.. Both nuclearcytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. J Biol Chem, 2004. 279 (40): p. 41882-41891.

Kawajiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K., Tachibana, M., Morohashi, K., Role of the LXXLL-motif and activation function 2 domain in subcellular localization of Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1). Mol Endocrinol, 2003. 17 (6): p. 994-1004.

Kelly, M.J., Ronnekleiv, O.K., Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. Mol Cell Endocrinol, 2008. 290 (1-2): p. 14-23.

Keyse, S.M., Emslie, E.A., Oxidative stress and heat shock induce a human geneencoding a protein-tyrosine phosphatase. Nature, 1992. 359 (6396): p. 644-647.

Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbé JC, Miller GJ, Hébert TE. The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. Pharmacol Rev. 2013 Feb 13;65(2):545-77.

Koritz, S.B., Kumar, A.M., On the mechanism of action of the adrenocorticotrophichormone. The stimulation of the activity of enzymes involved in pregnenolone synthesis.J Biol Chem, 1970. 245 (1): p. 152-159.

Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. Mol Endocrinol. 2002 Jul;16(7):1638-51

Lambeth, J.D., Xu, X.X., and Glover, M., Cholesterol sulfate inhibits adrenal mitochondrial cholesterol side chain cleavage at a site distinct from cytochrome P-450scc. Evidence for an intramitochondrial cholesterol translocator. J Biol Chem, 1987. 262(19): p. 9181-8.

Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B., Structural eterminants foractivation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. Nature, 1994. 369 (6482): p.621-628.

Langevin, H.M., Bouffard, N.A., Badger, G.J., Iatridis, J.C., Howe, A.K., Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch ex vivo and in vivo. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. 288 (3): p. C747-756.

Lavoie HA, King SR. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 andHSD3B. Exp Biol Med (Maywood) 2009;234:880–907.

Lefkowitz, R.J., G protein-coupled receptor kinases. Cell, 1993. 74(3): p. 409-12.

Lefkowitz, R.J., Seven transmembrane receptors: something old, something new. Acta Physiol (Oxf), 2007. 190 (1): p. 9-19.

Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV 2001 Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. Mol Endocrinol 15:184–200

Li J, Gorospe M, Hutter D, Barnes J, Keyse SM, Liu Y. Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. Mol Cell Biol. 2001 Dec;21(23):8213-24.

Li, C., Hu, Y., Mayr, M., Xu, Q., Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. J Biol Chem, 1999. 274 (36): p. 25273-25280.

Liang H, Venema VJ, Wang X, Ju H, Venema RC, Marrero MB. Regulation of angiotensin II-induced phosphorylation of STAT3 in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 1999 Jul 9;274(28):19846-51.

Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., 3rd, Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A., Miller, W.L., Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. Science, 1995. 267 (5205): p. 1828-1831.

Lin, Y.W., Yang, J.L., Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. J Biol Chem, 2006. 281 (2): p. 915-926.

Maillet, M., Purcell, N.H., Sargent, M.A., York, A.J., Bueno, O.F., Molkentin, J.D., 2008. DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility. Journal of Biological Chemistry 283, 31246–31255.

Manna, P.R., Chandrala, S.P., King, S.R., Jo, Y., Counis, R., Huhtaniemi, I.T., Stocco, D.M., Molecular mechanisms of insulin-like growth factor-I mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse leydig cells. Mol Endocrinol, 2006. 20 (2): p. 362-378.

Manna, P.R., Jo, Y., Stocco, D.M., Regulation of Leydig cell steroidogenesis byextracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase Csignaling. J Endocrinol, 2007. 193 (1): p. 53-63.

Manna, P.R., Stocco, D.M., Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression: functional and physiological consequences. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2005. 5 (1): p. 93-108.

Manna, P.R., Wang, X.J., Stocco, D.M., Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. Steroids, 2003. 68 (14): p. 1125-1134

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell. 2007 Jun 29;129(7):1261-74.

Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J.C., Touboul, T., Roux, D., Pouyssegur, J., Pages, G.. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogenactivated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. Molecular and Cellular Biology. 2005. 25, 854–864.

Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C. The emerging multiple roles of nuclear Akt. Biochim Biophys Acta. 2012 Dec;1823(12):2168-78.

Martin LJ, Boucher N, Brousseau C, Tremblay JJ. The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase I. Mol Endocrinol. 2008 Sep; 22 (9):2021-37.

Martin LJ, Boucher N, El-Asmar B, Tremblay JJ. cAMP-Induced Expression of the Orphan Nuclear Receptor Nur77 in MA-10 Leydig Cells Involves a CaMKI. Pathway Journal of Andrology. 2009. Vol. 30, No. 2

Martin LJ, Tremblay JJ. The nuclear receptors NUR77 and SF1 play additive roles with c-JUN through distinct elements on the mouse Star promoter. J Mol Endocrinol, 2009. 42:119–129

Martin LJ, Tremblay JJ. Glucocorticoids antagonize cAMP-induced Star transcription in Leydig cells through the orphan nuclear receptor NUR77. J Mol Endocrinol. 2008;41:165–175.

Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. Nuclear Receptor Signaling. 2006. 4:1–8.

Meloche, S., Pouyssegur, J., The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. Oncogene, 2007. 26 (22): p. 3227-3239.

Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. J Endocrinol. 2002 Aug; 174(2):195-204.

Metzler, B., Hu, Y., Sturm, G., Wick, G., Xu, Q., Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by arachidonic acid in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem, 1998. 273 (50): p. 33320-33326.

Miller DM, Flaherty KT. Cyclin-Dependent Kinases as Therapeutic Targets in Melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2014 Jan 9. doi: 10.1111/pcmr.12211.

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

Misra-Press, A., Rim, C.S., Yao, H., Roberson, M.S., Stork, P.J., A novel mitogenactivated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation. J Biol Chem, 1995. 270 (24): p. 14587-14596.

Mooradian, A.D., Morley, J.E., Korenman, S.G., Biological actions of androgens. Endocr Rev, 1987. 8 (1): p. 1-28.

Mori Sequeiros García MM, Gómez NV, Gorostizaga AB, Brion L, Acquier AB, Méndez CF, Paz C REVELANCE OF DIFFERENT ERK ½ PHOSPHORYLATION CONSENSUS SITES IN MKP-1 STABILITY IN LEYDIG CELLS.. XLVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre 2011. San Luis, Argentina.

Muda M, Boschert U, Dickinson R, Martinou JC, Martinou I, Camps M, Schlegel W, Arkinstall S. MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. J Biol Chem. 1996 Feb 23;271(8):4319-26.

Munshi A., Ramesh R. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. Genes Cancer. 2013 Sep;4(9-10):401-408.

Nichols A, Camps M, Gillieron C, Chabert C, Brunet A, Wilsbacher J, Cobb M, Pouyssegur J, Shaw J, and Arkinstall S. Substrate Recognition Domains within Extracellular Signal-regulated Kinase Mediate Binding and Catalytic Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-3. The journal of biological chemistry Vol. 275, No. 32, Issue of August 11, pp. 24613–24621, 2000

O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I 1998 Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. Endocrinology 139:1141–1146

Obata, T., Brown, G.E., Yaffe, M.B., MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. Crit Care Med, 2000. 28 (4 Suppl): p. N67-77.

Palm-Leis, A., Singh, U.S., Herbelin, B.S., Olsovsky, G.D., Baker, K.M., Pan, J., Mitogenactivated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatases mediate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the hypertrophic growth of cardiomyocytes. J Biol Chem, 2004. 279 (52): p. 54905-54917.

Park, Y., Maizels, E.T., Feiger, Z.J., Alam, H., Peters, C.A., Woodruff, T.K., Unterman, T.G., Lee, E.J., Jameson, J.L., Hunzicker-Dunn, M., 2005. Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression

coupled with positive signals from smad. Journal of Biological Chemistry 280, 9135–9148

Pawson, T., Gish, G.D., SH2 and SH3 domains: from structure to function. Cell, 1992. 71 (3): p. 359-362.

Paz C, Cornejo Maciel F, Maloberti P, Walsh LP, Stocco DM, Podestá EJ. Protein tyrosine phosphatases are involved in LH/chorionic gonadotropin and 8Br-cAMP regulation of steroidogenesis and StAR protein levels in MA-10 Leydig cells. J Endocrinol. 2002 Dec; 175(3):793-801.

Paz C, Cornejo Maciel F, Mendez C, Podesta EJ. Corticotropin increases protein tyrosine phosphatase activity by a cAMP-dependent mechanism in rat adrenal gland. Eur J Biochem. 1999 Nov; 265 (3):911-8.

Pierce, J.G. and Parsons, T.F., Glycoprotein hormones: structure and function. Annu Rev Biochem, 1981. 50: p. 465-95.

Ping Tai, Koji Shiraishi, and Mario Ascoli Activation of the Lutropin/Choriogonadotropin Receptor Inhibits Apoptosis of Immature Leydig Cells in Primary Culture. Endocrinology. 2009 August; 150(8): 3766–3773.

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

Podesta, E.J., Dufau, M.L., and Catt, K.J., Characterization of two forms of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase in rat testicular interstitial cells. Mol Cell Endocrinol, 1976. 5(1-2): p. 109-22.

Podesta, E.J., Dufau, M.L., Solano, A.R., and Catt, K.J., Hormonal activation of protein kinase in isolated Leydig cells. Electrophoretic analysis of cyclic AMP receptors. J Biol Chem, 1978. 253(24): p. 8994-9001.

Poon IK, Jans DA. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation?. Traffic. 2005 Mar;6(3):173-86.

Raman, M., Chen, W., Cobb, M.H., Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene, 2007. 26 (22): p. 3100-3112.

Reinhart, A.J., Williams, S.C., Stocco, D.M., Transcriptional regulation of the StAR gene. Mol Cell Endocrinol, 1999. 151 (1-2): p. 161-169

Roberson, M.S., Bliss, S.P., Xie, J., Navratil, A.M., Farmerie, T.A., Wolfe, M.W., Clay, C.M., Gonadotropin-releasing hormone induction of extracellular-signal regulated kinase is blocked by inhibition of calmodulin. Mol Endocrinol, 2005. 19 (9): p. 2412-2423.

Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J.A., Soria, B., Prentki, M., Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1. Diabetes, 1999. 48 (10): p. 2007-2014.

Rohan, P.J., Davis, P., Moskaluk, C.A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U., Kelly, K., PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. Science, 1993. 259 (5102): p. 1763-1766.

Romanov VS, Pospelov VA, Pospelova TV. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. Biochemistry (Mosc). 2012. 77(6):575-84.

Rössig L, Haendeler J, Hermann C, Malchow P, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis. J Biol Chem. 2000 Aug 18;275(33):25502-7.

Roux, P.P., Blenis, J., ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. 68 (2): p. 320-344.

Roy, S.K., Srivastava, R.K., Shankar, S., 2010. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. Journal of Molecular Signaling. 2010 Jul 5:10.

Ruff-Jamison, S., Chen, K., Cohen, S., Epidermal growth factor induces the tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of Stat 5 in mouse liver. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92 (10): p. 4215-4218.

Rusovici, R., Hui, Y.Y., Lavoie, H.A., Epidermal growth factor-mediated inhibition of follicle-stimulating hormone-stimulated StAR gene expression in porcine granulosa cells is associated with reduced histone H3 acetylation. Biol Reprod, 2005. 72 (4): p. 862-871.

Ryser, S., Tortola, S., Schlegel, W., Map kinase phosphatase-1 gene expression and regulation in neuroendocrine cells. J Recept Signal Transduct Res, 2002. 22 (1-4): p. 17-29.

Sanchez-Perez, I., Martinez-Gomariz, M., Williams, D., Keyse, S.M., Perona, R., CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. Oncogene, 2000. 19 (45): p. 5142-5152.

Saxena, M., Mustelin, T., Extracellular signals and scores of hosphatases: all roads lead to MAP kinase. Semin Immunol, 2000. 12 (4): p. 387-396.

Schaeffer, H.J., Weber, M.J., Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. Mol Cell Biol, 1999. 19 (4): p. 2435-2444.

Schimmer BP, Cordova M, Cheng H, Tsao A, Goryachev AB, Schimmer AD, Morris Q. Global profiles of gene expression induced by adrenocorticotropin in Y1 mouse adrenal cells. Endocrinology. 2006 May;147(5):2357-67.

Schlessinger, J., Lemmon, M.A., Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring. Cell, 2006. 127 (1): p. 45-48.

Schliess, F., Kurz, A.K., Haussinger, D., Glucagon-induced expression of the MAP kinase phosphatase MKP-1 in rat hepatocytes. Gastroenterology, 2000. 118 (5): p. 929-936.

Sedej, S., Rose, T., Rupnik, M., cAMP increases Ca^{2+}-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices. J Physiol, 2005. 567 (Pt 3): p. 799-813.

Sewer MB, Waterman MR. CAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells. J Biol Chem. 2003 Mar 7; 278(10):8106-11.

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

Shen T, Huang S. The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. Anticancer Agents Med Chem. 2012. 12(6):631-9.

Shin Fukuda, Makoto Orisaka, Kimihisa Tajima, Katsushige Hattori and Fumikazu Kotsuji. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. J Ovarian Res. 2009 Nov 16; 2(1):17.

Shiraishi K, Ascoli M. Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor in MA-10 cells stimulates tyrosine kinase cascades that activate ras and the extracellular signal regulated kinases (ERK1/2). Endocrinology. 2006 Jul;147 (7):3419-27.

Shiraishi K, Ascoli M. Lutropin/choriogonadotropin stimulate the proliferation of primary cultures of rat Leydig cells through a pathway that involves activation of the extracellularly regulated kinase 1/2 cascade. Endocrinology. 2007 Jul;148 (7):3214-25.

Simpson, E.R. and Boyd, G.S., The cholesterol side-chain cleavage system of the adrenal cortex: a mixed-function oxidase. Biochem Biophys Res Commun, 1966. 24(1): p. 10-7.

Simpson, E.R., Lund, J., Ahlgren, R., Waterman, M.R., Regulation by cyclic AMP of the genes encoding steroidogenic enzymes: when the light finally shines. Mol Cell Endocrinol, 1990. 70 (2): p. C25-28.

Skalhegg, B.S., Tasken, K., Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression,regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. Front Biosci, 2000. 5: p. D678-693.

Small, G.W., Shi, Y.Y., Edmund, N.A., Somasundaram, S., Moore, D.T., Orlowski, R.Z., Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. Mol Pharmacol, 2004. 66 (6): p. 1478-1490.

Smith, F.D., Scott, J.D., Anchored cAMP signaling: onward and upward - a short historyof compartmentalized cAMP signal transduction. Eur J Cell Biol, 2006. 85 (7): p. 585-592.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol Med. 2005. 9(1):59-71.

Song, K.H., Park, J.I., Lee, M.O., Soh, J., Lee, K., Choi, H.S., LH induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression in testicular Leydig cells. Endocrinology, 2001. 142 (12): p. 5116-5123.

Stocco, C.O., Lau, L.F., Gibori, G., A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. J Biol Chem, 2002. 277 (5): p. 3293-3302.

Stocco, D.M., Clark, B.J., Reinhart, A.J., Williams, S.C., Dyson, M., Dassi, B., Walsh, L.P., Manna, P.R., Wang, X.J., Zeleznik, A.J., Orly, J., Elements involved in the regulation of the StAR gene. Mol Cell Endocrinol, 2001. 177 (1-2): p. 55-59.

Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P.R., Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. Mol Endocrinol, 2005. 19 (11): p. 2647-2659.

Stoker, A.W., Protein tyrosine phosphatases and signalling. J Endocrinol, 2005. 185 (1):p. 19-33.

Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. Cell Signal. 1997 Aug; 9(5):337-51.

Sulimovici, S., Bartoov, B., and Lunenfeld, B., Localization of 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase in the inner membrane subfraction of rat testis mitochondria. Biochim Biophys Acta, 1973. 321(1): p. 27-40.

Tai P, Ascoli. Reactive oxygen species (ROS) play a critical role in the cAMP-induced activation of Ras and the phosphorylation of ERK1/2 in Leydig cells. M. Mol Endocrinol. 2011;25(5):885-93).

Tai P, Shiraishi K, Ascoli M. Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor inhibits apoptosis of immature Leydig cells in primary culture. Endocrinology. 2009. 150(8):3766-73.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., Nishida, E., A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. Nat Cell Biol, 2000. 2 (2): p. 110-116.

Tanoue, T., Nishida, E., Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. Pharmacol Ther, 2002. 93 (2-3): p. 193-202.

Tanoue, T., Yamamoto, T., Maeda, R., Nishida, E., A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. J Biol Chem, 2001. 276 (28): p. 26629-26639.

Tanoue, T., Yamamoto, T., Nishida, E., Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. J Biol Chem, 2002. 277 (25): p. 22942-22949.

Teerds KJ, De Rooji DG, Rommerts FFG, Wensing CJG 1988 The regulation of the proliferation and differentiation of rat Leydig cell precursor cells after EDS administration or daily hCG treatments. J Androl 9:343–351

Tonks, N.K., Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. 7 (11): p. 833-846.

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

Truong K, Lee TD, Li B, Chen Y. Sumoylation of SAE2 C terminus regulates SAE nuclear localization. J Biol Chem. 2012 Dec 14;287(51):42611-9.

Tuckey, R.C., Cholesterol side-chain cleavage by mitochondria from the human placenta. Studies using hydroxycholesterols as substrates. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. 42 (8): p. 883-890.

Van der Vusse, G.J., Kalkman, M.L., and van der Molen, H.J., 3Beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat testis tissue. Inter- and subcellular localization and inhibition by cyanoketone and nagarse. Biochim Biophys Acta, 1974. 348(3): p. 404-14.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif, 2003. 36 (3): p. 131-149.

Vignais, L., Oumesmar, B.N., Baron-Van Evercooren, A.B., PDGF-alpha receptor isexpressed by mature neurones of the central nervous system. Neuroreport, 1995. 6 (15): p. 1993-1996.

Vilgrain I, Cochet C, Chambaz EM. Hormonal regulation of a calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase in bovine adrenal cortex. J Biol Chem. 1984 Mar 25;259(6):3403-6.

Virshup, D.M., Shenolikar, S., From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. Mol Cell, 2009. 33 (5): p. 537-545.

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

Wang, J., Bixby, J.L., Receptor tyrosine phosphatase-delta is a homophilic, neuritepromoting cell adhesion molecular for CNS neurons. Mol Cell Neurosci, 1999. 14 (4-5):p. 370-384.

Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, Parker KL. The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. Mol Cell Biol. 1993;13:861–868

Wishart, M.J., Dixon, J.E., Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. Trends Biochem Sci, 1998. 23 (8): p. 301-306.

Woods DC, Johnson AL. Phosphatase activation by epidermal growth factor family ligands regulates extracellular regulated kinase signaling in undifferentiated hen granulosa cells. Endocrinology. 2006 Oct;147(10):4931-40. Epub 2006 Jul 13.

Wu, J.J., Bennett, A.M., Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. J Biol Chem, 2005. 280 (16): p. 16461-16466.

Wu, J.J., Zhang, L., Bennett, A.M., The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. Mol Cell Biol, 2005. 25 (11): p. 4792-4803.

Wu, Z., Jiao, P., Huang, X., Feng, B., Feng, Y., Yang, S., Hwang, P., Du, J., Nie, Y., Xiao, G., Xu, H., 2010. MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of Forkhead box O1 in mice. Journal of Clinical Investigation. 2010. 120, 3901–3911.

Yamashita S, Tai P, Charron J, Ko C, Ascoli M. The Leydig cell MEK/ERK pathway is critical for maintaining a functional population of adult Leydig cells and for fertility. Mol Endocrinol. 2011 Jul; 25 (7):1211-22.

Zeliadt NA, Mauro LJ, Wattenberg EV. Reciprocal regulation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and mitogen activated protein kinase phosphatase-3. Toxicol Appl Pharmacol. 2008 Nov 1;232(3):408-17.

Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. Mol Endocrinol. 2001 15:172–183

Zhang P, Mellon SH. Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. Mol Endocrinol. 1997;11:891–904.

Zhao, Q., Shepherd, E.G., Manson, M.E., Nelin, L.D., Sorokin, A., Liu, Y., The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. J Biol Chem, 2005. 280 (9): p. 8101-8108.

Zhao, Y., Zhang, Z.Y.. The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. Journal of Biological Chemistry. 2001. 276, 32382–32391.

Zhou, B., Wu, L., Shen, K., Zhang, J., Lawrence, D.S., Zhang, Z.Y., Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2. J Biol Chem, 2001. 276 (9): p. 6506-6515.

Zuniga, A., Torres, J., Ubeda, J., Pulido, R., Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. J Biol Chem, 1999. 274 (31): p. 21900-21907.