



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio biofísico del mecanismo de acción del receptor de glucocorticoides

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

Martin Dario Stortz

Directoras de Tesis: Dra. Adali Pecci
 Dra. Valeria Levi

Consejera de Estudios: Dra. Edith Kordon

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(Universidad de Buenos Aires-CONICET)

Buenos Aires, 2018

Estudio biofísico del mecanismo de acción del receptor de glucocorticoides

El núcleo celular es una organela con una organización espacial muy compleja. Los componentes responsables de las distintas funciones nucleares, como la replicación y la reparación del ADN, la transcripción y el procesamiento del ARN, no se encuentran distribuidos homogéneamente en el espacio nuclear sino compartimentalizados en diferentes dominios subnucleares, definidos por ácidos nucleicos y/o proteínas.

En este trabajo de Tesis, se propuso estudiar la organización dinámica de un factor de transcripción en el núcleo, utilizando como modelo el receptor de glucocorticoides (GR), un factor de transcripción activado por ligando. El uso clínico de glucocorticoides otorga una especial relevancia al estudio del mecanismo de acción del receptor, en el marco de la búsqueda de ligandos que conserven los efectos deseados de los glucocorticoides (anti-inflamatorios e inmunosupresores) pero minimicen sus efectos adversos (metabólicos).

Mediante el uso de microscopía confocal y de técnicas basadas en espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) se exploró la distribución espacial subnuclear del GR y su dinámica intranuclear en células vivas en cultivo, con el fin de establecer ciertas correlaciones entre estos aspectos y la actividad transcripcional del GR.

Los resultados muestran que, en células no estimuladas, el GR inactivo se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que NCoA-2 —un importante coactivador de receptores nucleares— se acumula en dominios focales nucleares identificados como cuerpos de leucemia promielocítica (PML). La unión al GR de un agonista como dexametasona (Dex) promueve una redistribución espacial de ambas proteínas, que pasan a colocalizar e interactuar en múltiples *foci* subnucleares. Se demostró además que estos *foci* son estructuras dinámicas dependientes de la integridad del ADN y presentan un recambio rápido (~1 s) de sus componentes con el nucleoplasma.

Por otra parte, se demostró que el receptor y el coactivador difunden dentro del núcleo y pueden interactuar con sitios de distinta especificidad en la cromatina, caracterizados por tiempos de interacción de ~500 y ~50 ms (denominados sitios lentos y rápidos, respectivamente). Una dinámica similar se detectó al estudiar la interacción del GR con un arreglo de múltiples copias de un promotor conteniendo secuencias *blanco* del GR, introducido en el genoma de una línea celular. La activación con Dex produce un aumento tanto del tiempo de residencia como de la unión de GR a los sitios lentos en el ADN. Esta unión puede ser

favorecida además por la sobreexpresión de NCoA-2. De manera simétrica, la activación del GR promueve la unión al coactivador y el reclutamiento de éste a los sitios lentos.

Con el objetivo de correlacionar la funcionalidad del receptor con la distribución espacial y la dinámica que presenta en el núcleo, se utilizaron mutantes del GR y ligandos que al unirse al receptor producen variantes conformacionales con actividad transcripcional deficiente. En algunos casos, se observó que la incapacidad transcripcional se ve acompañada por una dinámica y una distribución intranucleares diferentes y, especialmente, una deficiencia en la capacidad de interactuar con NCoA-2.

En conclusión, la partición dinámica de un factor de transcripción en diferentes reservorios nucleares constituye un mecanismo regulatorio que impactaría en su función biológica. El enfoque clásico del factor de transcripción interactuando *in vitro* con su secuencia *blanco* implica no tener en cuenta todas las interacciones que ocurren en el núcleo de células vivas. El conjunto de estas interacciones define la disponibilidad local del factor de transcripción y, en última instancia, las posibilidades de interactuar con secuencias *blanco* y regular la expresión génica.

Palabras clave: receptor de glucocorticoides, coactivador, NCoA-2, factor de transcripción, arquitectura nuclear, *foci*, dinámica intranuclear, espectroscopía de correlación de fluorescencia.

Biophysical study of the glucocorticoid receptor mechanism of action

The cell nucleus is an organelle with a complex spatial organization. The components involved in the different nuclear functions, such as DNA replication and repair, transcription and RNA processing, are not homogeneously distributed in the nuclear space but compartmentalized in different subnuclear domains.

In this Thesis, we aimed to study the dynamical organization of a transcription factor in the nucleus, using as a model the glucocorticoid receptor (GR), a ligand-activated transcription factor. The clinical use of glucocorticoids and the need of new synthetic ligands that keep the desired, anti-inflammatory, immunosuppressive effects of glucocorticoids but reduce their adverse, metabolic effects require a precise knowledge of the receptor mechanism of action.

By using confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy (FCS)-based techniques, we explored the spatial subnuclear distribution of the GR and its intranuclear mobility in live cultured cells and found some correlations between these features and GR transcriptional activity.

The results show that the inactive GR preferentially localizes in the cytoplasm in non-stimulated cells, while NCoA-2 (a relevant coactivator of nuclear receptors) accumulates in nuclear focal domains identified as promyelocytic leukemia (PML) bodies. GR binding to an agonist such as dexamethasone (Dex) promotes the spatial redistribution of both proteins that co-localize and interact in multiple subnuclear foci. We demonstrate that these foci are dynamic structures that depend on DNA integrity and present a rapid exchange (~ 1 s) of their components with the nucleoplasm.

Additionally, the receptor and its coactivator diffuse within the nucleus and may interact with different chromatin targets, characterized by interaction times of ~ 500 and ~ 50 ms (named as long- and short-lived sites, respectively). The interactions of GR with a tandem array of a promoter containing GR target sequences, introduced in a cell line genome, are in the same time scale. Dex-activation produces an increment of both, the long-lived residence time and the relative population of the receptor bound to long-lived sites. NCoA-2 overexpression also promotes this binding. Symmetrically, GR activation favors the interaction with the coactivator and its recruitment to longer-lived sites.

In order to correlate the functionality of the receptor with its intranuclear distribution and dynamics we used receptor mutants and ligands that produce GR conformational variants with poor transcriptional activity. In certain cases, we observed that the impairment of transcription is associated with faster dynamics, homogeneous subnuclear distribution and specially a deficient interaction with NCoA-2.

In summary, the dynamical partition of transcription factors in different nuclear reservoirs may impact on their biological function. These interactions as a whole define the local availability of the transcription factor and ultimately the chances to interact with target sequences and regulate gene expression.

Keywords: glucocorticoid receptor, coactivator, NCoA-2, transcription factor, nuclear architecture, foci, intranuclear dynamics, fluorescence correlation spectroscopy.

Agradecimientos

La realización de esta Tesis no fue un proceso individual sino que fue posible gracias a muchísima gente que me ayudó con su ejecución material y, no menos importante, me brindó un invaluable apoyo anímico y moral. Estoy muy agradecido a todos los que me acompañaron este tiempo y me llevaré lindos recuerdos de estos años. En particular, quiero agradecer a las siguientes personas:

A mis directoras Adali y Valeria. A Adali por recibirme en su laboratorio cuando era un estudiante muy joven y guiarme en mi crecimiento científico. A Vale por llevarme al *Lado Oscuro* de la microscopía y enseñarme los secretos de este mundo. A ambas por su dedicación, por alentarme a hacer estadías en el exterior, por generar un ambiente de trabajo cómodo pero a la vez exigente, por darme confianza y libertad para desarrollar mis ideas pero a la vez encauzarme en buen rumbo. Considero que formamos un buen equipo estos años, con debates caóticos, entretenidos y fructíferos. Aprendí mucho de ellas.

A todos los integrantes pasados y presentes del laboratorio, no sólo del grupo Pecci sino también en su versión extendida al grupo Kordon: Chocha, Flopy, Dieguito, Edith, Silvio, Meli, Dan, Marquitos, Vir, Johi, Vicky, Lautaro, Carinota, Mica *La Pistolera*, Mariana, Caro, Santi, Stephi, Mica Silber, Lucho, Carla, Emilia, Carinita. En este gran *guiso* de personalidades que es el laboratorio viví un ambiente cálido, ameno, divertido y solidario. Gracias por seguirme en mis delirios y por ayudarme siempre que lo necesité.

A un gran amigo, compañero y vecino como Dieguito, con quien compartí casi nueve años de viajes, chistes, chismes, consejos. A mis amigos *viejitos* que ya no están más en el labo, Andrés y Leo.

A todos mis compañeros del IFIBYNE y el CM1. Me llevo los mejores recuerdos del Nuevo Edificio, la pasé muy bien estos años y sobretodo me llevo muchas proteínas de tanta carne ingerida. A toda la gente de los grupos Coso, De Souza, Kornblihtt y Srebrow. A mis vecinas Adri (Flavia), Viki, Dai, Domi y al *Triángulo de la Distracción*, con Silvio y Martín en los otros dos vértices.

A Diego, por enviarme varios plásmidos y por realizar en el NIH los experimentos de N&B y en el MMTV. Por introducirme en el tema del GR y la microscopía, por su enorme

predisposición para ayudarme a resolver múltiples dudas y problemas científicos. Considero que haber *heredado* la línea de investigación con la que trabajó en el laboratorio significó haber arrancado el doctorado con una ventaja.

A todos los integrantes (y futuros compañeros) del Laboratorio de Dinámica Intracelular. Especialmente a Luciana por la elaboración de las rutinas de *Tracking* en MATLAB, a Juan por su paciencia para enseñarme a usar MCell-FERNET, y a Diana por su gran ayuda a adaptarme al LFD en mis primeras semanas.

A los técnicos y todas las personas que integran el IFIBYNE, cuya función es vital para el funcionamiento del Instituto. Quiero agradecer especialmente a Amaranta por su gran esfuerzo para proveerme de las tantas preparaciones de plásmidos que necesité.

A todos los integrantes del *Laboratory for Fluorescence Dynamics*, en Irvine, California, por recibirme cálidamente. A Enrico por aceptarme en su laboratorio, enseñarme con su hipnótica didáctica y darme todas las herramientas para llevar a cabo mi investigación. A Paolo por guiarme en los experimentos de FCS de barrido orbital. A la IUBMB por otorgarme la beca Wood-Whelan que me permitió realizar esta estadía.

Al laboratorio de Gerardo Burton y especialmente a Virginia por ponerse al hombro la síntesis del ligando 21-OH.

A todos los argentinos por haberme brindado con mucho esfuerzo, a través de la Universidad de Buenos Aires, el CONICET y la Agencia, la posibilidad de hacer un posgrado y financiar mediante becas y subsidios mi investigación. Después de 25 años consecutivos de educación pública y de calidad, me quedan una gratitud y un orgullo enormes, y el compromiso por defenderla.

A mi familia y a mis amigos de la Quinta, la Facultad, fútbol, por estar siempre ahí, por sostenerme en las malas y darme momentos de risa, satisfacción. A mis viejos por el apoyo incondicional. A Lau y Arián. A Camilo por enseñarme que algo tan chiquito y simple puede emocionar tanto y traer tanta alegría.

A Mili por todo el amor y las risas que hacen más placentera la vida. Por escucharme y bancarme especialmente en etapas críticas de envíos de *papers* y escritura de Tesis. Por su ojo implacable para asistirme con el formato final de esta Tesis.

Índice

Publicaciones y financiamiento	13
Abreviaturas	15
Introducción: 1. Estructura y función del núcleo celular	19
1.1. Cromatina	21
1.1.1. Fibra cromatínica de 10 nm	22
1.1.2. Fibras cromatínicas de orden mayor	25
1.1.3. Territorios cromosómicos	25
1.2. Cuerpos subnucleares	27
1.2.1. Cuerpos de leucemia promielocítica (PML)	29
1.3. Transcripción	30
1.3.1. ARN polimerasas y maquinaria transcripcional	30
1.3.2. Compartimentalización del proceso de transcripción	32
1.3.3. Regulación de la transcripción	34
1.3.3.1. Secuencias regulatorias de la transcripción	35
1.3.3.2. Factores regulatorios de la transcripción	36
Introducción: 2. Receptor de glucocorticoides	39
2.1. Fisiología del GR	41
2.2. Farmacología del GR	42
2.3. Estructura proteica del GR	44
2.3.1. Dominio N-terminal (NTD)	44
2.3.2. Dominio de unión al ADN (DBD)	45
2.3.3. Dominio de unión al ligando (LBD)	46
2.4. Activación y mecanismo de acción del GR	46
2.4.1. Unión del ligando y translocación del GR a núcleo	46
2.4.2. Acción del GR	48
2.4.2.1. GR como factor de transcripción	49
2.4.2.2. GR como modulador de otros factores de transcripción	50
2.5. Especificidad y regulación de la acción del GR	51
2.5.1. Expresión de correguladores del GR	52
2.5.1.1. El coactivador NCoA-2	53
2.6. Modelo disociado de acción del GR	54
2.7. Dimerización del GR y unión al ADN	56

2.8. Ligandos sintéticos del GR	57
2.8.1. Dexametasona (Dex)	58
2.8.2. 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21-OH)	59
Introducción: 3. Dinámica de biomoléculas en el núcleo	61
3.1. Métodos de microscopía de fluorescencia en células vivas	63
3.1.1. Recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP)	66
3.1.2. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)	66
3.1.3. Seguimiento de molécula individual (SMT)	68
3.2. Influencia de la topología intranuclear en la dinámica de biomoléculas	69
3.3. Influencia de las interacciones intranucleares en la dinámica de biomoléculas	71
3.4. Dinámica intranuclear de factores de transcripción	72
3.4.1. Interacciones entre TF y la cromatina	72
3.4.2. Interacciones específicas entre TF y la cromatina	73
3.4.3. Interacciones inespecíficas entre TF y la cromatina	74
3.5. Distribución y dinámica intranuclear del receptor de glucocorticoides	76
3.5.1. Formación de <i>foci</i> subnucleares de GR	76
3.5.2. Dinámica intranuclear del GR	77
4. Objetivos	79
5. Materiales y métodos	83
5.1. Esteroides	85
5.2. Cultivo celular	85
5.3. Preparación de muestras celulares	86
5.4. Transfecciones transitorias	86
5.4.1. Plásmidos	86
5.4.2. Preparación de plásmidos a gran escala	88
5.4.2.1. Preparación de bacterias competentes	88
5.4.2.2. Transformación de bacterias competentes	88
5.4.2.3. Preparación de plásmidos	89
5.4.3. Transfección por lipofección	89
5.5. Tratamientos hormonales	92
5.6. Digestión con nucleasas <i>in situ</i>	92
5.7. Ensayos de gen reportero	93
5.8. Obtención de imágenes por microscopía confocal	94
5.9. Análisis de <i>foci</i> intranucleares	95

5.10. Determinación cuantitativa de la colocación de <i>foci</i>	95
5.11. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS).....	96
5.11.1. Obtención de datos experimentales	96
5.11.2. Obtención de datos de simulaciones	97
5.11.3. Análisis de datos	100
5.11.4. Cálculo de constante de asociación	101
5.11.5. Ajuste de datos	102
5.12. Número y Brillo (N&B)	104
5.12.1. Obtención de datos experimentales	104
5.12.2. Obtención de datos por simulaciones.....	105
5.12.2. 1. Cálculos accesorios para simulaciones	105
5.12.3. Análisis de datos	109
5.12.4. Predicción teórica de ensayos de 2C-N&B.....	111
5.13. Análisis estadístico	111
Resultados: 6. Distribución espacial del GR.....	113
6.1. Distribución intranuclear del GR	115
6.2. Influencia de la conformación del GR en su distribución intranuclear	118
6.3. Distribución intranuclear de GR y el coactivador NCoA-2	120
6.4. Evolución temporal de la redistribución intranuclear de GR y NCoA-2.....	124
6.5. Caracterización bioquímica estructural de los foci de GR y NCoA-2.....	126
6.6. Dinámica de GR y NCoA-2 en los <i>foci</i>	129
6.7. Simulaciones de experimentos de FCS	133
6.8. Conclusiones parciales.....	140
Resultados: 7. Dinámica temporal del GR	141
7.1. Dinámica intranuclear de GFP.....	143
7.2. Dinámica intranuclear de GFP-GR	145
7.3. Influencia de la conformación del GR en su dinámica intranuclear	148
7.4. Efectos de la sobreexpresión de NCoA-2 sobre la dinámica intranuclear del GR	151
7.5. Dinámica intranuclear de NCoA-2.....	154
7.6. Formación de complejos GR/NCoA-2 en el núcleo.....	157
7.7. Interacción entre GR y una región enriquecida en elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE).....	159
7.7.1. Reclutamiento de GR al arreglo MMTV	160
7.7.2. Dinámica de la interacción de GR con el arreglo MMTV	161

7.7.3. Dinámica de la interacción de GR y NCoA-2 con el arreglo MMTV	165
7.8. Efecto del coactivador NCoA-2 sobre la actividad transcripcional de los mutantes GRdim y GRmon	167
7.9. Conclusiones parciales	168
Resultados: 8. Análisis de interacciones por “Número y Brillo en dos colores”	171
8.1. Fundamentos del método de N&B en dos colores	173
8.2. Aplicación del método de número y brillo en un color	174
8.3. Análisis de 2C-N&B a partir de simulaciones de un sistema sencillo	175
8.4. Análisis de 2C-N&B a partir de simulaciones de un sistema complejo	177
8.5. Análisis de 2C-N&B a partir de datos experimentales	179
8.6. Conclusiones parciales	182
9. Discusión	183
9.1. Distribución espacial de GR/Dex y el coactivador NCoA-2	186
9.2. Dinámica intranuclear de GR/Dex	189
9.3. Dinámica y organización nuclear de GR/21-OH	192
9.4. Dinámica y organización intranuclear de GRdim	193
9.5. Dinámica y organización intranuclear de GRmon	194
9.6. Análisis de las propiedades de distintas conformaciones del GR	195
10. Conclusiones finales	201
11. Referencias	205

Publicaciones y financiamiento

Publicaciones relacionadas directamente con el trabajo de Tesis:

Stortz M., Presman DM, Bruno L, Annibale P, Dansey MV, Burton G, Gratton E, Pecci A*, Levi V* (2017). "Mapping the Dynamics of the Glucocorticoid Receptor within the Nuclear Landscape". *Scientific Reports*, 7, 6219

Stortz M, Angiolini JF, Mocskos E, Wolosiuk A, Pecci A, Levi V (2017). "Mapping the Dynamical Organization of the Cell Nucleus through Fluorescence Correlation Spectroscopy". *Methods*, Dec 15. pii: S1046-2023(17)30223-2. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.12.008. [Epub ahead of print]

Publicaciones relacionadas indirectamente con el trabajo de Tesis:

Presman DM, Ogara MF*, **Stortz M***, Alvarez LD, Pooley JR, Schiltz RL, Grøntved L, Johnson TA, Mittelstadt PR, Ashwell JD, Ganesan S, Burton G, Levi V, Hager GL, Pecci A (2014). "Live Cell Imaging Unveils Multiple Domain Requirements for In Vivo Dimerization of the Glucocorticoid Receptor". *PLoS Biology*, 12(3), e1001813

Angiolini JF, **Stortz M**, Steinberg PY, Mocskos E, Bruno L, Soler-Illia G, Angelomé PC, Wolosiuk A, Levi V (2017). "Diffusion of single dye molecules in hydrated TiO₂ mesoporous films". *Phys Chem Chem Phys.*, 19(39), 26540-26544

Financiamiento

CONICET

ANPCyT

Universidad de Buenos Aires

IUBMB - Wood Whelan Research Fellowships

Abreviaturas

21-OH	21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona
2C-N&B	N&B en dos colores
ACF	función de autocorrelación
AD	dominio de activación
ADP	adenosín difosfato
AF	función de activación
AP-1	proteína activadora 1
AR	receptor de andrógenos
ARNr	ARN ribosomal
ATP	adenosín trifosfato
BHK	riñón de hámster bebé
Bmi1	proteína del complejo polycomb
BP	pasa banda
BRG1	gen 1 relacionado a Brahma
c-Myc	oncogén de mielocitomatosis
CARM1	metiltransferasa 1 de arginina asociado a coactivadores
CBP	proteína de unión a CREB
CCF	función de correlación cruzada
CMV	citomegalovirus
Cos	Origen CV1 con virus SV40
CRC	<i>Cancer Research Center</i>
CREB	unión a elemento de respuesta a AMP cíclico
CTCF	factor de unión a CCCTC
Daxx	proteína asociada a dominio de muerte
DBD	dominio de unión al ADN
Dex	dexametasona
DMEM	medio Eagle modificado de Dulbecco
DNasa	desoxirribonucleasa
EGFP	GFP mejorada
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ER	receptor de estrógenos
FCS	espectroscopía de correlación de fluorescencia
FCCS	espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia
FERNET	<i>Fluorescence Emission Recipes and Numerical routines Toolkit</i>

FKBP	proteína de unión a FK506
FLASH	proteína enorme asociada a FLICE
FRAP	recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo
GaAsP	fosfo-arseniuro de galio
GC	glucocorticoide
GFP	proteína fluorescente verde
GR	receptor de glucocorticoides
GRE	elemento de respuesta a glucocorticoides
GRIP1	proteína interactora 1 del GR
HAP	proteína asociada a ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1
HAT	acetiltransferasa de histonas
HDAC	deacetilasa de histonas
HILO	hoja óptica altamente inclinada y laminar
Hop	proteína organizadora de Hsp70-Hsp90
HPA	eje hipotalámico-pituitario-adrenal
HSF1	factor 1 de choque térmico
Hsp	proteína de choque térmico
JNK	quinasa de c-Jun N-terminal
kb	kilobase
KO	<i>knock-out</i>
LacZ	β -galactosidasa
LB	Luria-Bertani
LBD	dominio de unión al ligando
LRBGE	<i>Laboratory of Receptor Biology and Gene Expression</i>
LFD	<i>Laboratory for Fluorescence Dynamics</i>
LP	pasa alto
LSM	microscopio de barrido de láser
Luc	luciferasa
Mb	megabase
mCh	mCherry
MMTV	virus de tumor mamario murino
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MR	receptor de mineralocorticoides
MSD	desplazamiento cuadrático medio
N&B	número y brillo
NCoA	coactivador de receptores nucleares
NCoR	correpresor de receptores nucleares

NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NF κ B	factor nuclear potenciador de kappa en células B
NLS	señal de localización nuclear
NONO	proteína de unión a octámero conteniendo un dominio non-POU
NPAT	proteína nuclear de ataxia telangiectasia
NPC	complejo del poro nuclear
NRID	dominio de interacción con receptores nucleares
NTD	dominio N-terminal
nTRip6	proteína interactora nuclear 6 del receptor de hormona tiroidea
Oct	factor de transcripción octámero
P/CAF	factor asociado a CBP/p300
pb	pares de bases
PBS	solución fosfato salina
Pc2	proteína 2 de polycomb
PFA	paraformaldehído
PIC	complejo de preiniciación
Pipes	ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
PML	leucemia promielocítica
Pol	ARN polimerasa
PR	receptor de progesterona
PRMT1	N-metiltransferasa 1 de arginina
PSF	función de dispersión de punto
PSP1	componente 1 de <i>paraspeckles</i>
PTB	unión a tracto de polipirimidinas
RAC3	coactivador 3 asociado a receptor
Rb	proteína de retinoblastoma
RD	dominio de represión
RICS	espectroscopía de correlación de imagen de trama
RNasa	ribonucleasa
RU486	mifepristona
SC-35	factor de <i>splicing</i> rico en serina/arginina
SDM	espejo dicróico
SFB	suero fetal bovino
SMN	supervivencia de neurona motora
SMRT	mediador de silenciamiento de receptores de hormona tiroidea y ácido retinoico
SMT	seguimiento de moléculas individuales
SR	receptor de esteroides

Abreviaturas

SRC	coactivador de receptores de esteroides
SRSF	factor de <i>splicing</i> rico en serina/arginina
STAT	transductor de señal y activador de la transcripción
SUMO	modificador tipo ubiquitina pequeña
SWI/SNF	switch/sacarosa no fermentable
TAD	dominio topológicamente asociado
TBP	proteína de unión a TATA
TE	Tris-EDTA
TF	factor de transcripción
TFB	solución de transformación
TFII	factor general de transcripción II
TIF2	factor intermediador transcripcional 2
TSS	sitio de inicio de la transcripción
Veh	vehículo
VMC	vecino más cercano
wt	salvaje

Introducción:

1. Estructura y función del núcleo celular

«El universo (que otros llaman la Biblioteca) se compone de un número indefinido, y tal vez infinito, de galerías hexagonales, con vastos pozos de ventilación en el medio, cercados por barandas bajísimas. Desde cualquier hexágono se ven los pisos inferiores y superiores: interminablemente. La distribución de las galerías es invariable. Veinte anaqueles, a cinco largos anaqueles por lado, cubren todos los lados menos dos; su altura, que es la de los pisos, excede apenas la de un bibliotecario normal. Una de las caras libres da a un angosto zaguán, que desemboca en otra galería, idéntica a la primera y a todas. (...)

A cada uno de los muros de cada hexágono corresponden cinco anaqueles; cada anaquel encierra treinta y dos libros de formato uniforme; cada libro es de cuatrocientas diez páginas; cada página, de cuarenta renglones; cada renglón, de unas ochenta letras de color negro. También hay letras en el dorso de cada libro; esas letras no indican o prefiguran lo que dirán las páginas.»

Jorge L. Borges

La biblioteca de Babel (1941)

La presencia del núcleo es una característica distintiva de las células eucariotas, que de hecho deben su nombre a esta organela (del griego *eu*, 'verdadero', y *karyon*, 'nuez' o 'núcleo'). El núcleo alberga la mayor parte del material genético de la célula, determinando que sus funciones principales estén íntimamente relacionadas con procesos tales como la regulación de la expresión génica y la duplicación del ADN durante la división celular.

El núcleo se encuentra delimitado por la envoltura nuclear, que consiste en una doble membrana cuya función es separar físicamente el citoplasma del nucleoplasma, el medio viscoelástico en el cual se embeben los componentes nucleares. El intercambio de material entre ambos espacios subcelulares ocurre de manera selectiva y regulada a través de los poros nucleares [1].

Como se verá más adelante, la organización espacial intranuclear es muy compleja, y se encontraría íntimamente ligada a las funciones que allí se desarrollan [2]. Por ello, la comprensión de procesos fundamentales como la transcripción, el *splicing* y la replicación y reparación del ADN requiere considerar también la arquitectura nuclear que permite la ejecución regulada de estos procesos.

A diferencia del espacio citoplasmático, caracterizado por organelas, la compartimentalización subnuclear no involucra membranas lipídicas como barreras físicas de dichos compartimentos [3]. Esta compartimentalización sin barreras representaría una gran ventaja biológica en términos de eficiencia y regulación de los procesos bioquímicos vitales, ya que permite generar entornos físicoquímicos particulares y mecanismos regulatorios específicos. Como se verá más adelante, la arquitectura de la cromatina juega un papel fundamental en la organización espacial intranuclear.

En los últimos años, el desarrollo de novedosas técnicas de microscopía y de secuenciación masiva ha permitido profundizar nuestro conocimiento acerca de ciertos aspectos relacionados con la organización espacio-temporal de las funciones biológicas nucleares [2-5].

1.1. Cromatina

En eucariotas, la cromatina está formada por ADN, proteínas y ARN. Las proteínas mayoritarias son las histonas, con funciones regulatorias y estructurales en la compactación del

ADN. Por otra parte, el ARN no codificante incluido en la cromatina también cumple un rol estructural [6, 7].

El núcleo de una célula humana contiene un genoma diploide de un tamaño aproximado de 6.5×10^9 pb; si las cadenas de ADN se extendieran linealmente ocuparían una longitud de ~2 m [8]. Por este motivo, el material genético presenta un elevado grado de compactación, con distintos niveles jerárquicos de organización (Figura 1.1). Esta estructura modula y a su vez es modulada por los procesos de transcripción, reparación y duplicación del ADN [5].

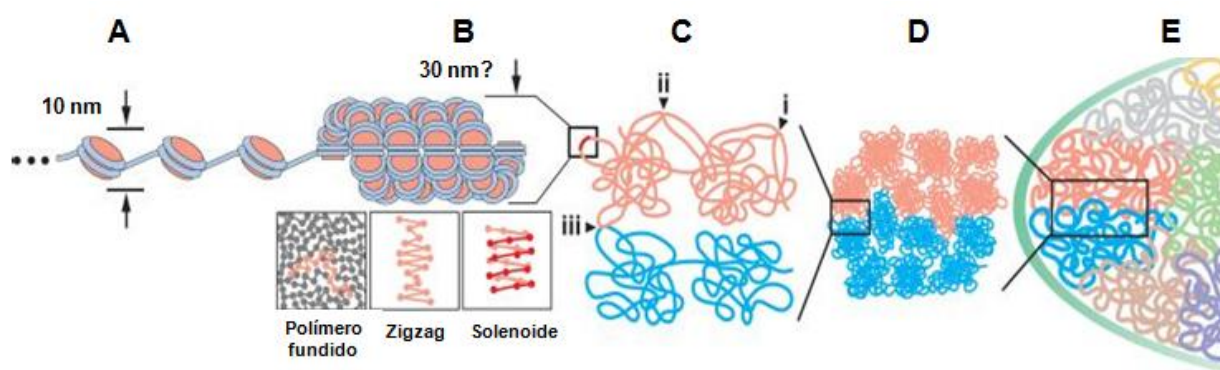


Figura 1.1. Niveles de jerarquía en la organización de la cromatina. (A) Fibra cromatínica de 10 nm tipo “collar de perlas”. (B) Fibra cromatínica de 30 nm y detalles de las tres estructuras propuestas: polímero fundido, zigzag o solenoide (panel inferior). (C) Las fibras cromatínicas de 30 nm presentan Interacciones dentro de un mismo dominio globular (i), entre dominios de un mismo territorio cromosómico (ii) o entre dominios de territorios adyacentes (iii). Mientras que las primeras presentan una alta probabilidad, la frecuencia de las segundas y terceras son baja y muy baja, respectivamente. (D) Organización de las fibras cromatínicas de 30 nm en dominios globulares. (E) Los cromosomas (cadenas de distintos colores) se encuentran organizados en territorios cromosómicos. Modificado de [9].

1.1.1. Fibra cromatínica de 10 nm

En un primer orden de compactación, 147 pb de ADN se enrollan en 1.7 vueltas superhelicoidales alrededor de un core octamérico de histonas formando el nucleosoma, la unidad básica de empaquetamiento [10] esquematizada en la Figura 1.2. La estructura canónica del nucleosoma está formada por dos heterodímeros de histonas H3-H4 y H2A-H2B [11]. A su vez, los nucleosomas están separados entre sí por 20-80 pb de ADN espaciador asociado a histona H1, conformando entonces motivos repetitivos de ~200 pb. Esta forma de

organización se asemeja a la de un collar de perlas y conforma una fibra de 10 nm de diámetro [12] (Figura 1.1A).

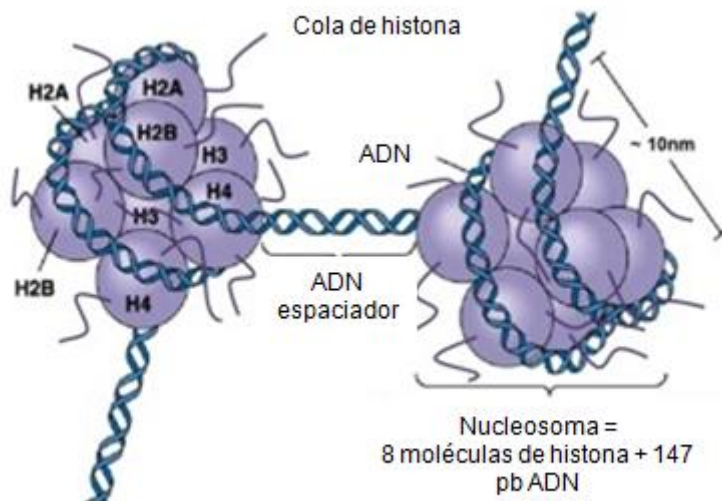


Figura 1.2. Esquema del nucleosoma. Representación esquemática de la estructura de un nucleosoma, conformado por un octámero de histonas [(H2A-H2B)x2, (H3-H4)x2] sobre el cual se enrollan 147 pb de ADN. Considerando el ADN espaciador, cada nucleosoma representa una unidad cromatínica de ~200 pb. Modificado de [13].

El ADN, negativamente cargado, interactúa con las superficies positivamente cargadas de las histonas. Esta interacción reduce parcialmente la repulsión electrostática que implicaría empaquetar el polímero desnudo de ADN en el núcleo celular [14]. Sin embargo, la cantidad de cargas positivas en el *core* de histonas no compensa totalmente la cantidad de cargas negativas en el ADN; la histona espaciadora H1 y ciertos cationes proveen cargas positivas adicionales que favorecen la compactación [15].

La disposición de los nucleosomas en el genoma no es aleatoria sino que en algunas regiones sigue una organización espacial determinada con funciones regulatorias específicas (Figura 1.3). Los promotores transcripcionalmente activos poseen una región libre de nucleosomas, flanqueada por nucleosomas bien posicionados, es decir, cuya posición se conserva en todas las células de una población. Estos nucleosomas, denominados +1 y -1, se encuentran a distancias regulares a un lado y al otro del sitio de inicio de la transcripción (TSS) [16]. Río abajo del nucleosoma +1, se observan nucleosomas localizados a intervalos regulares

pero luego el posicionamiento nucleosomal se vuelve más aleatorio [16] (Figura 1.3). Este arreglo nucleosomal particular en el promotor permite el acceso de factores regulatorios y facilita la transcripción.

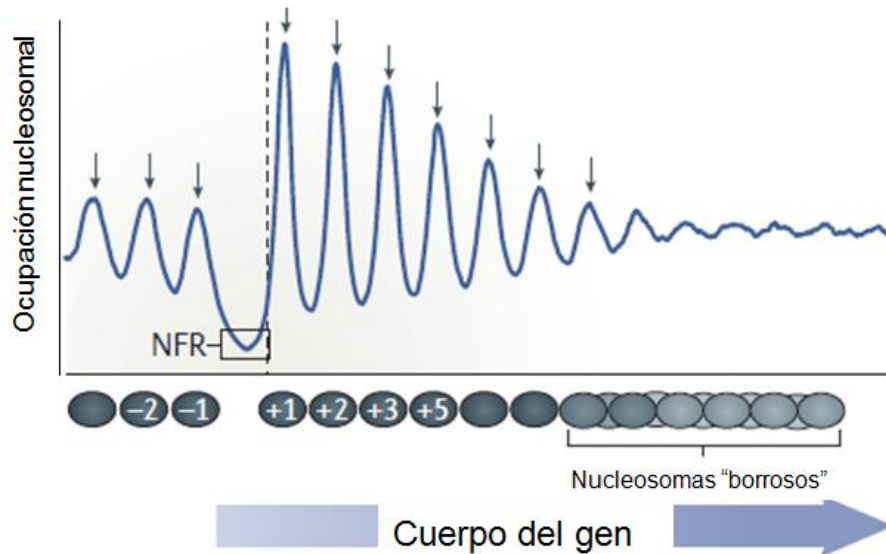


Figura 1.3. Posicionamiento de nucleosomas en genes. Los picos y valles señalan la ocupación típica de nucleosomas a lo largo del cuerpo de un gen. Los nucleosomas denominados -1 y +1 delimitan la region libre de nucleosomas (NFR), dentro del cual se encuentra el sitio de inicio de la transcripción (TSS) (línea punteada). A distancias más lejanas y dentro del cuerpo del gen, el posicionamiento nucleosomal se vuelve aleatorio (nucleosomas "borrosos"), lo que implica una mayor variabilidad intercelular e intrapoblacional en la posición de los nucleosomas. Modificado de [16].

Si bien las interacciones ADN-histonas son relativamente estables, existe un comportamiento dinámico de los nucleosomas en la cromatina que puede ser modulado y que tiene consecuencias regulatorias sobre procesos como la transcripción y la replicación. En particular, los nucleosomas pueden deslizarse sobre el ADN cambiando su posición [17] o pueden disociarse parcial o completamente [16, 18]. El posicionamiento de los nucleosomas está influenciado en *cis* por la secuencia de ADN [19] y en *trans* por ciertas proteínas remodeladoras de la cromatina [20-23]. Si bien existe permanentemente una interacción dinámica entre el ADN y el core de histonas en la cromatina, durante los procesos de transcripción y replicación [16] se favorece la disociación ADN-histonas.

No todos los nucleosomas presentan la estructura canónica. Se ha observado que existe un continuo de estructuras subnucleosomales que van desde el ADN libre al nucleosoma canónico. Por otra parte la composición de los nucleosomas presenta diversos grados de variabilidad [8] y se ha propuesto que estas variantes de histonas regularían ciertos procesos que involucran al ADN [24]. Por ejemplo, la histona H2A.Z, una variante de H2A, está presente preferencialmente en promotores y elementos distales potenciadores, favoreciendo la transcripción [24, 25].

Las histonas además pueden sufrir una variedad de modificaciones postraduccionales que tienen consecuencias en la dinámica de nucleosomas y por tanto en la regulación de la transcripción [26], ya que el acceso de la maquinaria transcripcional requiere de la relajación local de la cromatina. Estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y ADP-ribosilación [27], y pueden ocurrir tanto en el *core* como en las colas de las histonas. Algunas modificaciones impactan directamente en las interacciones histona-histona o ADN-histona, alterando de esta manera la dinámica nucleosomal [26]. Otras modulan el reclutamiento de diversos remodeladores de la cromatina [26].

1.1.2. Fibras cromatínicas de orden mayor

En contraste a la gran información disponible relacionada a la organización de la cromatina formando una fibra de 10 nm, se desconocen aspectos importantes acerca de cómo esta fibra se organiza tridimensionalmente (Figura 1.1). Se ha observado en experimentos *in vitro* que la fibra cromatínica de 10 nm puede adquirir una estructura helicoidal, con 6-11 nucleosomas por vuelta, formando una fibra de 30 nm de diámetro [28] (Figura 1.1B). La organización interna de esta fibra puede ser explicada por un modelo de solenoide [28, 29] o de zigzag [30]. Sin embargo, la evidencia de la existencia de fibras de 30 nm *in vivo* se limita a pocos tipos celulares [31] y se postula que podría ser consecuencia de artefactos en las técnicas experimentales utilizadas [15].

1.1.3. Territorios cromosómicos

Durante interfase, los cromosomas no se distribuyen aleatoriamente dentro del núcleo sino que ocupan regiones específicas de 2-4 μm de diámetro [32], denominadas territorios

cromosómicos [33] (Figura 1.1E). Las fronteras de estos territorios se encuentran parcialmente superpuestas entre sí [34].

La organización en territorios cromosómicos define que la posición relativa de genes dentro del núcleo no siga una distribución aleatoria. Este posicionamiento es a su vez dependiente del grado de diferenciación celular y cambia a lo largo del desarrollo y en situaciones patológicas [35, 36].

Dentro de estos territorios cromosómicos se definen ciertas regiones denominadas dominios topológicamente asociados (TAD) [37-39] con tamaños de ~1 Mb. En los TAD se agrupan regiones de ADN que comparten un mismo entorno regulatorio y características estructurales y químicas de la cromatina [40]. De esta manera se propician interacciones entre secuencias de un mismo TAD, a través de lazos (*loops*) [41, 42] estabilizados por proteínas tales como CTCF y cohesina [37, 39, 43], que anclan los lazos en su base y son necesarios para delimitar las fronteras de los TAD [40].

Se ha observado una correlación entre la funcionalidad y la estructura de los territorios cromosómicos; en particular, aquellos TAD represivos en cuanto a la actividad transcripcional se localizan en el centro del territorio y los TAD activos se extienden hacia la periferia del territorio [44, 45]. La correlación entre disposición espacial y función queda también en evidencia en el hecho de que la activación de algunos genes requiere del movimiento de la región de la cromatina que incluye al gen, formando lazos por fuera del territorio cromosómico correspondiente [46, 47]. Por otra parte, los TAD asociados a la lámina nuclear (estructura de filamentos en contacto con la envoltura nuclear) y a los cromocentros (regiones de heterocromatina alrededor de los centrómeros) tienden a presentar una menor aunque no nula actividad transcripcional [48-51].

Es importante enfatizar que los territorios cromosómicos no son estructuras sólidas, sino altamente porosas, permeadas por canales nucleoplásmicos y que por lo tanto exponen una alta superficie de contacto a biomoléculas que difunden en el nucleoplasma [33]. Cremer y col. [52] proponen que la arquitectura de la cromatina modela el *paisaje* intranuclear generando compartimentos funcionalmente activos e inactivos (Figura 1.4). El compartimento inactivo estaría conformado por dominios cromatínicos compactos, transcripcionalmente inactivos [52]. Por otra parte, el compartimento activo está constituido por una red tridimensional de canales intercromatínicos que comunican a las distintas regiones del núcleo entre sí y con los poros

nucleares, y regiones pericromatínicas accesibles a estos canales, representadas por lazos de cromatina descondensada, rica en genes transcripcionalmente activos [52].

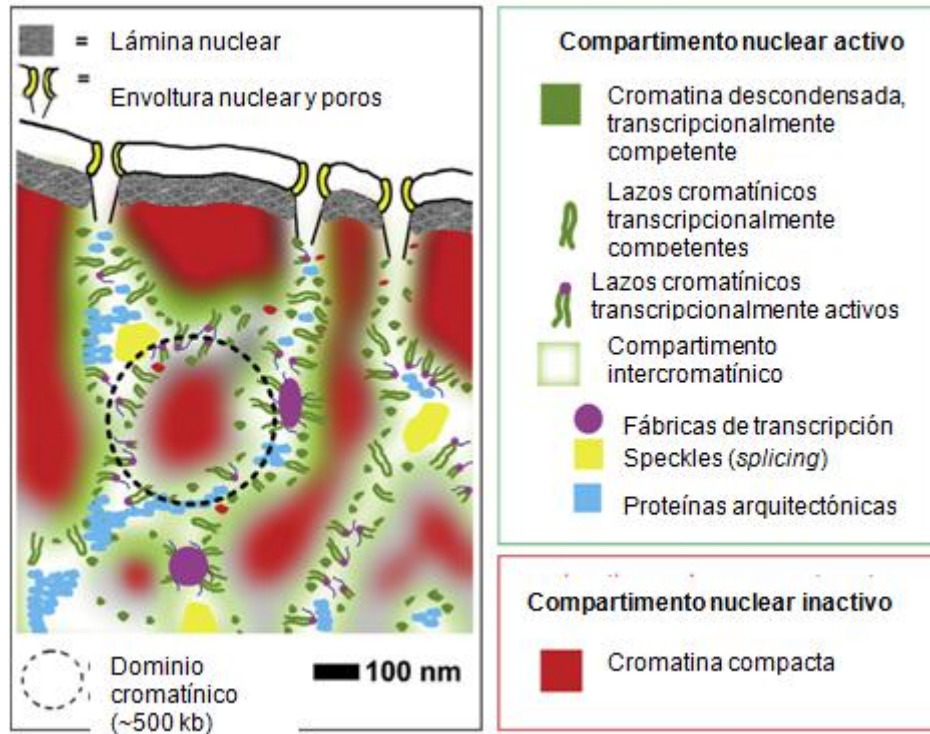


Figura 1.4. Esquema propuesto para la organización funcional global de la cromatina en el núcleo. La organización nuclear de la cromatina incluye un compartimento inactivo compuesto por cromatina compacta y un compartimento activo, conformado por el compartimento intercromatínico (comunicado con los poros nucleares) y regiones de cromatina descondensada en las cuales ocurre transcripción activa. Modificado de [52].

1.2. Cuerpos subnucleares

Se ha mencionado previamente que, al igual que el citoplasma, el núcleo está organizado en subcompartimentos, aunque a diferencia de las organelas citoplasmáticas éstos no están delimitados por membranas lipídicas.

Existen varios tipos de dominios o cuerpos subnucleares, que pueden ser identificados principalmente por la acumulación de ciertas biomoléculas distintivas, por su morfología y/o por su patrón de distribución dentro del núcleo [53]. Estos cuerpos subnucleares se componen de

proteínas y, en algunos casos, también ácidos nucleicos. Muchas de las proteínas que los conforman tienen propiedades de auto-asociación [54-56]. La Tabla 1.1 resume las propiedades y principales funciones asignadas a los cuerpos subnucleares más conocidos.

Cuerpo subnuclear	Número por núcleo	Tamaño (µm)	Componentes	Funciones
Cuerpo de Cajal	0-10	0.1-2.0	Coilin, SMN	Ensamblado y longitud de telómeros. Biogénesis y procesamiento de ARN pequeños
Clastosoma	0-3	0.2-1.2	Proteasoma	Actividad proteasomal
Cuerpo de locus de histona	2-4	0.2-1.2	NPAT, FLASH	Transcripción y procesamiento de genes de histonas
<i>Speckle</i> nuclear	20-50	1-3	SRSF1, SRSF2, Malat1	Almacenamiento y reciclado de factores de <i>splicing</i>
Cuerpo nuclear de estrés	2-10	0.3-3.0	HSF1, HAP	Respuesta a estrés (transcripción y <i>splicing</i>)
Nucleolo	1-4	0.5-8.0	Maquinaria transcripcional de Pol I	Síntesis y procesamiento de ARN ribosomal. Ensamblado de ribosomas
<i>Paraspeckle</i>	2-20	0.2-1.0	PSP1, Neat1, NONO	Regulación de ARN mensajeros y edición de ARN
Compartimento perinucleolar	1-4	0.2-1.0	PTB	Regulación de un subgrupo de transcritos de Pol III
Cuerpo de leucemia promielocítica	10-30	0.3-1.0	PML	Respuesta a estrés, infección viral e inestabilidad genómica, mediante secuestro, modificación y degradación de proteínas
Cuerpo de Polycomb	12-16	0.3-1.0	Bmi1, Pc2	No se conoce función en mamíferos

Tabla 1.1. Características de cuerpos subnucleares. Extraído de [53, 57].

Los cuerpos subnucleares son estructuras dinámicas ya que presentan un intercambio constante de su contenido con el nucleoplasma [58, 59]. Su biogénesis y su desensamblado se

encuentran regulados [53] y pueden responder dinámicamente a diversas condiciones fisiológicas, de estrés o patológicas, modificando su número y tamaño [60-63].

Es importante destacar que la funcionalidad de ciertos subcompartimentos nucleares está aún en discusión; algunos autores sugieren que, en algunos casos, la formación de éstos es simplemente consecuencia de la agregación de proteína que localmente se encuentra muy concentrada [64]. Otros autores han postulado que estos subcompartimentos podrían actuar como reservorios de material inactivo [65], regulando indirectamente la concentración disponible de determinadas biomoléculas en el nucleoplasma [65]. También se propuso a los cuerpos subnucleares como sitios especializados en los que se favorece la formación de complejos funcionales y/o la ejecución de determinados procesos bioquímicos [66-68]. Las “fábricas de transcripción”, como se verá más adelante, constituyen un ejemplo de este último caso.

1.2.1. Cuerpos de leucemia promielocítica (PML)

A continuación se detallarán las propiedades de los cuerpos PML, ya que son tratados en este trabajo de Tesis.

Los cuerpos PML son estructuras esféricas de 0.1- 1 μm de diámetro, se encuentran 5-15 copias por célula y su composición puede ser exclusivamente proteica [69, 70] o puede contener también ADN [71, 72].

La Figura 1.5 muestra esquemáticamente la composición y la estructura de un cuerpo PML. Las proteínas distintivas de este tipo de cuerpos subnucleares pertenecen a la familia PML y poseen propiedades de auto-asociación [56, 73]. Las proteínas PML se encuentran en una capa externa de los cuerpos y presentan intercambio con el nucleoplasma [74]. El interior del cuerpo es accesible a una gran diversidad de proteínas interactoras [73], que presentan una movilidad reducida con respecto a la movilidad en el nucleoplasma (Figura 1.5) [75]. Tanto PML como los interactores reclutados a los cuerpos PML se encuentran SUMOilados [61].

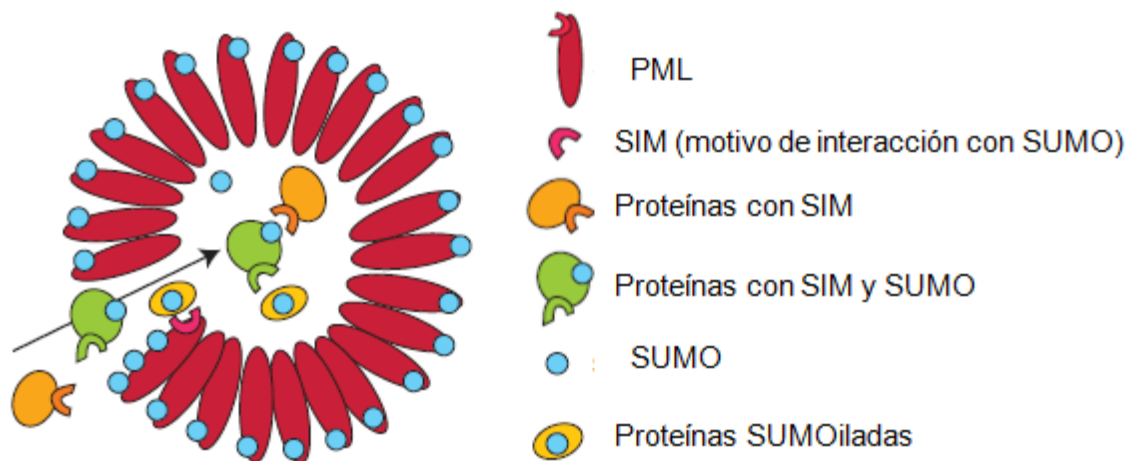


Figura 1.5. Estructura de cuerpos PML. La proteína PML SUMOilada forma la capa externa del cuerpo. En el interior se reclutan proteínas SUMOiladas y/o con motivo de interacción con SUMO (SIM). Modificado de [73].

La forma, el tamaño, el número y la localización de los cuerpos PML puede cambiar en respuesta a diversos estímulos de estrés [73]. Sus variadas funciones celulares incluyen la regulación de la transcripción, la replicación del ADN, la apoptosis, la senescencia y la respuesta a daño del ADN e infecciones virales [61]. Las evidencias sugieren que los cuerpos PML funcionan como plataformas que concentran diversas proteínas, favoreciendo su activación [76], secuestro [77] o degradación [78].

1.3. Transcripción

La transcripción es el proceso por el cual el ADN es utilizado como molde para la síntesis de una cadena complementaria de ARN. Dado que en la presente Tesis se estudió a un factor de transcripción, este proceso se describirá en las secciones siguientes.

1.3.1. ARN polimerasas y maquinaria transcripcional

En eucariotas existen tres enzimas ARN polimerasas (Pol) que catalizan la transcripción de distintos tipos de genes: Pol I, Pol II y Pol III, formadas por 14, 12 y 17 subunidades, respectivamente. Algunas subunidades son compartidas entre sí y otras son particulares de

cada enzima [79]. Pol I cataliza en los nucleolos la transcripción de los ARN ribosomales (ARNr) excepto el 5S [80]. Pol III cataliza la transcripción de una gran variedad de ARN no codificantes pequeños: ARN de transferencia, ARNr 5S, ARN nucleolar pequeño, ARN spliceosomal U6, ARN de ribonucleasa P, entre otros [81].

Pol II cataliza la transcripción de todos los precursores de ARN mensajero, es decir, los genes que codifican a todas las proteínas de la célula. Además, cataliza la transcripción de micro-ARN, ARN nuclear pequeño y ARN pequeño de interferencia [82, 83]. La enzima interactúa con otros factores formando la maquinaria transcripcional general.

El reclutamiento de Pol II al promotor de un gen a transcribir requiere la participación de factores de transcripción (TF) específicos que tienen la capacidad de unirse a secuencias cercanas al TSS. Estos factores favorecen el reclutamiento de Pol II directamente a través de interacciones con la maquinaria transcripcional o indirectamente reclutando otros factores que modifican la cromatina haciéndola más accesible [84].

La Figura 1.6 muestra esquemáticamente las etapas involucradas en el proceso transcripcional. La maquinaria transcripcional es reclutada al promotor mínimo, que se extiende aproximadamente entre -35 y +35 pb con respecto al TSS [85]. Sobre el promotor se ensambla el complejo de pre-iniciación (PIC), conformado por Pol II y los factores generales de la transcripción TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH [84]. El complejo proteico Mediador funciona como coactivador ya que media interacciones entre Pol II y TF que pueden encontrarse en regiones distales, como secuencias potenciadoras [86] (Figura 1.6). Los factores generales de la transcripción inducen la fusión del ADN doble cadena en el promotor. TFIIH, por ejemplo, contiene actividad ADN helicasa y también fosforila el dominio C-terminal de Pol II, indispensable para la síntesis de ARN [87].

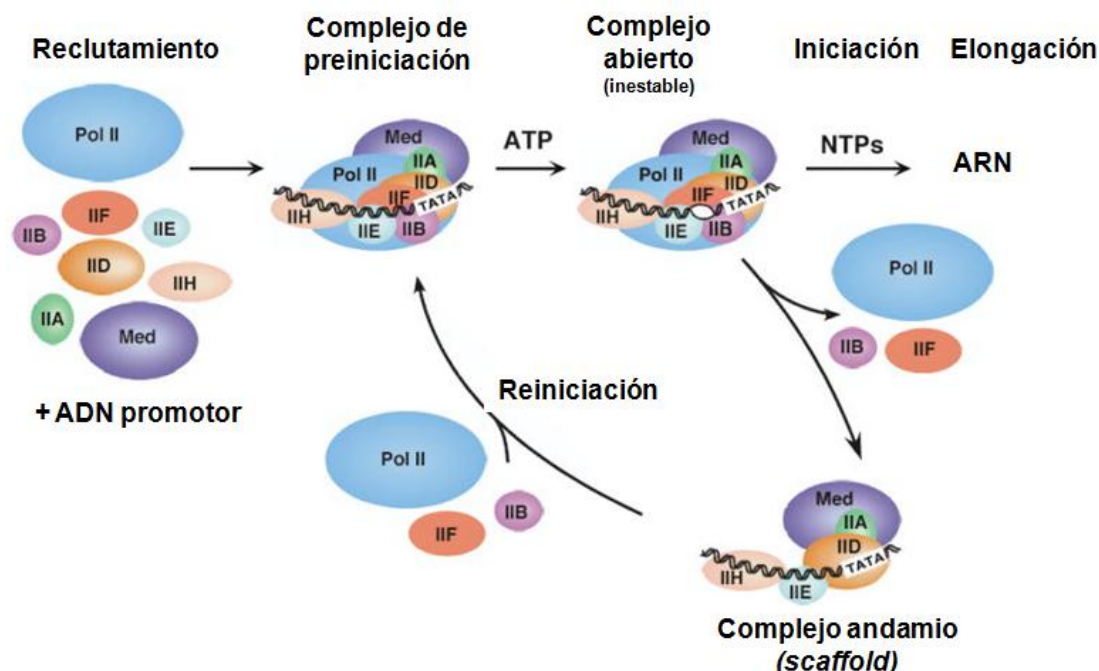


Figura 1.6. Ciclo de transcripción de Pol II. Pol II y los factores generales de la transcripción IIB, IIF, IIE, IID, IIH, IIA y Mediador (Med) se reclutan al promotor formando el PIC, en un estado inactivo. Un cambio conformacional en el ADN permite la formación del complejo abierto, en un estado activo. La iniciación y la elongación transcripcionales requieren de Pol II. Varios de los factores generales permanecen unidos al promotor formando un complejo andamio, que facilita ciclos de reiniciación subsiguientes. Modificado de [84].

Existen varios modelos que explican el ensamblado de este complejo. Según el modelo secuencial, TBP, una subunidad de TFIID, es la primera que se une al promotor mínimo, y luego secuencialmente se reclutan los restantes componentes del PIC [84, 88]. Según otra hipótesis, el PIC se pre-ensambla y se une al promotor [88].

En los últimos años se puso en evidencia la naturaleza estocástica de la transcripción [89] y en particular la estocasticidad en la formación del complejo de iniciación de la transcripción [90, 91].

1.3.2. Compartimentalización del proceso de transcripción

Las ARN polimerasas no se distribuyen homogéneamente dentro del núcleo sino que se acumulan en múltiples dominios focales. Esta observación permitió postular el concepto de

“fábricas de transcripción” para denominar a los centros de acumulación de maquinaria transcripcional que pueden transcribir múltiples genes simultáneamente [4]. La Figura 1.7 muestra un esquema de fábrica de transcripción conformada por Pol II.

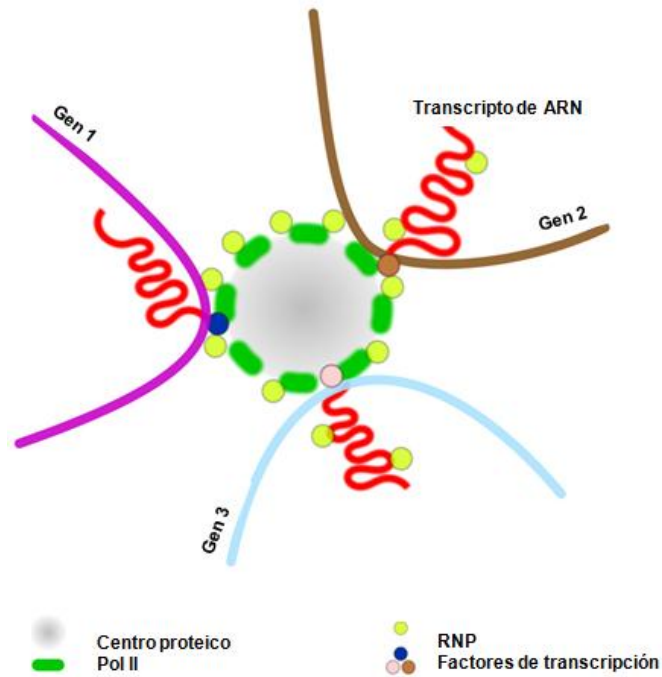


Figura 1.7. Compartimentalización de Pol II en fábricas de transcripción. Estructura de una fábrica de transcripción de Pol II. Cada fábrica contiene decenas de moléculas de Pol II sobre la superficie de un centro proteico, entre los que incluyen TF, coactivadores, remodeladores de la cromatina, ribonucleoproteínas (RNP), enzimas modificadoras de histonas, factores de *splicing* y procesamiento. Múltiples genes (líneas celeste, marrón y magenta) pueden ser procesados en una misma fábrica. Las líneas rojas representan los transcritos de ARN. Modificado de [92].

Pol I forma parte de la fábrica de transcripción de mayor tamaño: el nucleolo. Este compartimento subnuclear conforma la estructura citológica más prominente del núcleo y es rica en ARN y proteínas [93]. Su función consiste en la síntesis y maduración del ARNr, y la producción de ribosomas [94]. La fábrica nucleolar posee un centro fibrilar con una alta concentración de Pol I, y la transcripción ocurre en la superficie de este centro fibrilar [95]. El ARN naciente comienza a ser procesado en el componente denso fibrilar que circunda el centro

fibrilar, y la maduración de las subunidades ribosomales se completa en el componente granular del nucleolo [95].

Por otra parte, Pol II y Pol III se distribuyen en *foci* discretos denominados “fábricas de transcripción” [96-98]. La cantidad de fábricas de transcripción en el núcleo se encuentra en el orden de 10^3 - 10^4 [4]. Si bien la cantidad dependería del tipo celular, la densidad nuclear de fábricas y su diámetro (50-175 nm) son similares en distintos tipos celulares [4, 99, 100].

Se ha propuesto que prácticamente toda la transcripción ocurre en fábricas [101] y que cada fábrica tiene ~10 moléculas de Pol II activas transcribiendo sobre distintos moldes [99].

Según el modelo tradicional de transcripción, la Pol se mueve a lo largo de un molde fijo de ADN a medida que transcribe. Sin embargo, bajo el modelo de fábricas de transcripción, múltiples Pol adheridas a una fábrica de transcripción actúan sobre varios moldes. La inmovilización de la Pol durante la transcripción activa implica el movimiento del ADN molde con respecto al sitio de polimerización. Las fábricas incluyen no sólo a las Pol sino también altas concentraciones de otros componentes de la maquinaria transcripcional [4, 102] (Figura 1.7). Dado que estas fábricas interactúan con lazos de cromatina, contribuyen indirectamente a la organización espacial del genoma [103].

Recientemente, experimentos de seguimiento de moléculas individuales de Pol II han permitido observar un recambio rápido de polimerasas en las fábricas de transcripción y que varias moléculas de Pol II pueden actuar en simultáneo a lo largo de un mismo molde [104], sugiriendo la necesidad de reevaluar el modelo tradicional de fábricas de transcripción.

1.3.3. Regulación de la transcripción

La regulación de la transcripción constituye una función fundamental para la vida. Permite integrar señales externas e internas de un organismo, brindando una respuesta biológica: cuándo, dónde y cuánto se expresan los genes. En organismos multicelulares, además, es fundamental para el desarrollo y la diferenciación celular. Existe una gran variedad de mecanismos regulatorios que permiten una modulación fina y sofisticada de la expresión génica a distintos niveles. Estos mecanismos actúan a nivel del acceso de la maquinaria transcripcional y TF a la cromatina y en las etapas de iniciación, elongación y terminación.

Intervienen elementos en *trans* (factores regulatorios) que se unen a elementos en *cis* (secuencias regulatorias).

1.3.3.1. Secuencias regulatorias de la transcripción

Los genes poseen, tanto río arriba como río abajo del promotor mínimo, secuencias regulatorias que actúan en *cis* a las cuales se unen diversos factores regulatorios que pueden modular la transcripción [105] (Figura 1.8).

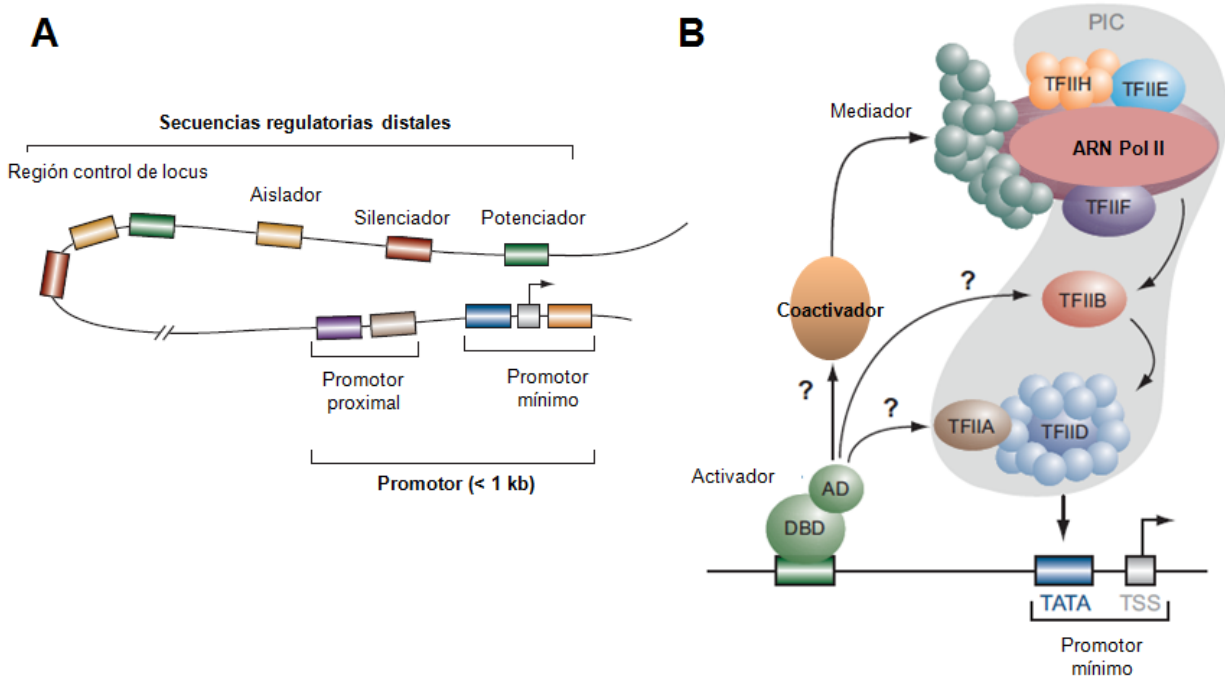


Figura 1.8. Regulación de la transcripción en eucariotas. (A) El promotor (< 1 kb) se compone de las secuencias promotoras proximales y el promotor mínimo. Las secuencias regulatorias distales pueden estar a 1 Mb del promotor y pueden estar integradas por regiones control de locus, aisladores, silenciadores y potenciadores. Estos elementos pueden interactuar con el promotor mediante la formación de lazos de ADN. **(B)** Las secuencias regulatorias, ya sean proximales o distales, reclutan factores de transcripción activadores, que poseen por lo general un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de activación (AD). Los activadores pueden interactuar directa o indirectamente (a través de coactivadores) con la maquinaria transcripcional. Modificado de [105].

El promotor mínimo funciona como plataforma del ensamblado de la maquinaria de transcripción basal, y define a su vez el TSS y la dirección de la transcripción [85]. Las

variaciones en la secuencia del promotor mínimo pueden contribuir a la especificidad regulatoria de cada gen [85].

El promotor proximal se encuentra en el rango de los cientos de bases río arriba del promotor mínimo, y puede contener varios sitios de unión para distintos TF. Los elementos regulatorios a los que se unen los TF suelen ocupar 6-12 pb, en los que usualmente 4-6 bases definen la especificidad de la unión. Estas secuencias suelen estar degeneradas, por lo que se habla de secuencias consenso [106]. Un mismo TF puede unir entonces una variedad de secuencias, que pueden afectar la afinidad de unión del factor regulatorio [107], regular la preferencia del TF por heterodimerizar con otros factores [106, 108] o alterar la conformación del TF de manera que cambie su actividad [109, 110].

Los potenciadores (*enhancers*) y los silenciadores son secuencias regulatorias distales que actúan favoreciendo o inhibiendo la transcripción, respectivamente, independientemente de la distancia y su orientación relativa en el ADN. Se pueden encontrar >100 kb río arriba del promotor mínimo, o incluso río abajo, en un intrón o más allá del extremo 3' de un gen [111, 112]. La comunicación entre elementos distales y el promotor es posible por la formación de lazos en el ADN [113].

Un mismo TF puede unirse a promotores proximales o a potenciadores, ya que pueden contener las mismas secuencias [114]. A su vez, un mismo promotor puede ser regulado modularmente por distintos potenciadores en forma independiente o interdependiente [115].

Los silenciadores unen proteínas regulatorias denominadas represores, que a su vez pueden reclutar correpresores [116]. Existen múltiples mecanismos propuestos de represión incluyendo la competencia por un mismo sitio [117], el bloqueo de la unión de un TF activador [118], el reclutamiento de enzimas que favorecen la compactación de la cromatina [119] o la inhibición del ensamblado del PIC [120].

1.3.3.2. Factores regulatorios de la transcripción

Los factores regulatorios se unen directa o indirectamente al ADN y modulan la actividad transcripcional. Pueden ser TF que se unen específicamente a secuencias consenso en el ADN o corre reguladores reclutados por estos factores. De esta manera, la especificidad en

la regulación transcripcional puede estar dada no sólo por la expresión y/o activación de TF sino también por la expresión de correguladores que permiten que un mismo TF pueda regular positiva o negativamente la transcripción [121].

Típicamente, los TF poseen al menos un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de activación (AD), responsable de su actividad [122] (Figura 1.8). Existen distintas familias de TF que difieren en la estructura del DBD [108]. Una característica notable de los TF es que pueden actuar sinérgicamente a través de la cooperatividad de un mismo factor [123] o de distintos tipos de factores [124].

La acción de los TF puede centrarse en promover la formación del PIC [122, 125] o favorecer la ejecución de las etapas de iniciación, elongación o reiniciación [126].

Estos factores además pueden reclutar enzimas tales como remodeladores de cromatina dependientes de ATP y complejos modificadores de histonas [126, 127] que modifican la compactación y por ende la accesibilidad de la cromatina [121, 128]. El reclutamiento puede ser directo o indirecto, por intermedio de correguladores [129, 130].

En este capítulo se detalló la organización espacial del núcleo, caracterizada por la arquitectura de la cromatina y la existencia de diversos cuerpos subnucleares. La ejecución y regulación de la transcripción ocurre en este complejo contexto espacial.

Introducción:

2. Receptor de glucocorticoides

«Desde entonces no me duele la soledad, porque sé que vive mi redentor y al fin se levantará sobre el polvo. Si mi oído alcanzara todos los rumores del mundo, yo percibiría sus pasos. Ojalá me lleve a un lugar con menos galerías y menos puertas. ¿Cómo será mi redentor?, me pregunto. ¿Será un toro o un hombre? ¿Será tal vez un toro con cara de hombre? ¿O será como yo?»

Jorge L. Borges
La casa de Asterión (1947)

El receptor de glucocorticoides (GR) pertenece a la familia de receptores de esteroides (SR), integrada también por los receptores de progesterona (PR), de estrógenos (ER), de mineralocorticoides (MR) y de andrógenos (AR), entre otros. Los SR forman parte a su vez de la superfamilia de los receptores nucleares [131, 132], los cuales son TF activados por ligando y participan en la regulación de múltiples funciones fisiológicas [131]. Las hormonas esteroideas, ligandos naturales de los SR, son moléculas lipofílicas que derivan del colesterol y comparten una estructura química común, con modificaciones sobre el esqueleto carbonado del ciclopentanoperhidrofenantreno que varían según la hormona [133].

Los SR comparten una gran similitud de secuencia aminoacídica y por lo tanto adquieren conformaciones parecidas. Por este motivo, existen múltiples reacciones cruzadas entre las vías de señalización de los distintos SR. Por ejemplo, un mismo ligando puede unirse a diferentes receptores, como son los casos del cortisol (ligando natural del GR que se une también al MR [134]), la progesterona (ligando natural del PR que interactúa con el MR [135]) y la mifepristona (RU486) (se une tanto al GR como al PR [136]). Además, distintos receptores pueden unirse a los mismos elementos de respuesta en el ADN: de hecho GR, PR, MR y AR reconocen la misma secuencia nucleotídica [137]. Los distintos miembros de la familia, y de otros receptores nucleares, pueden interactuar también con los mismos coactivadores y correpresores de la transcripción [138]. Todas estas propiedades pueden generar efectos no esperados en tratamientos farmacológicos.

2.1. Fisiología del GR

El cortisol en mamíferos no roedores y la corticosterona en roedores son los glucocorticoides (GC) naturales mayoritarios. Estas hormonas son sintetizadas principalmente en la zona fasciculata de la corteza de la glándula adrenal, y tanto su síntesis como su secreción al sistema circulatorio están controladas por el sistema nervioso central a través del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) [139]. La activación de este eje está influida por diversos factores, como el estrés, la actividad física, las infecciones y los ritmos circadianos [140-142]. El GR media la acción hormonal de los GC y participa en el control de varios procesos fisiológicos.

Dado que el GR se expresa en prácticamente todos los tipos celulares, los GC producen efectos en todos los sistemas fisiológicos del organismo. En concentraciones sistémicas basales, regulan principalmente el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Contribuyen a aumentar la glucemia mediante la inducción de la gluconeogénesis en el hígado, y de la proteólisis y la lipólisis en órganos periféricos. En situaciones de estrés, se produce un aumento significativo de los niveles circulantes de GC, y se observan también sus efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores. Los GC actúan en este caso sobre distintos tipos celulares del sistema inmune, inhibiendo la síntesis y/o la liberación de citoquinas [143, 144].

Además, los GC ejercen una influencia relevante sobre una gran variedad de sistemas y procesos, como el sistema nervioso central [145], el desarrollo embrionario [146], la proliferación y la muerte celulares [147].

2.2. Farmacología del GR

Los GC son una de las drogas más utilizadas, crónica u ocasionalmente, por la población mundial (la prevalencia de GC orales en población adulta de distintos países ronda el 1% [148]). Debido a sus efectos inmunosupresores y anti-inflamatorios (Figura 2.1), se diseñó y sintetizó una amplia variedad de agonistas sintéticos del GR, que se utilizan para tratar desórdenes inflamatorios, enfermedades autoinmunes y el rechazo inmunológico en trasplantes de órganos [149, 150], así como también en terapias combinadas para algunos tratamientos anti-tumorales [149] (Figura 2.1).

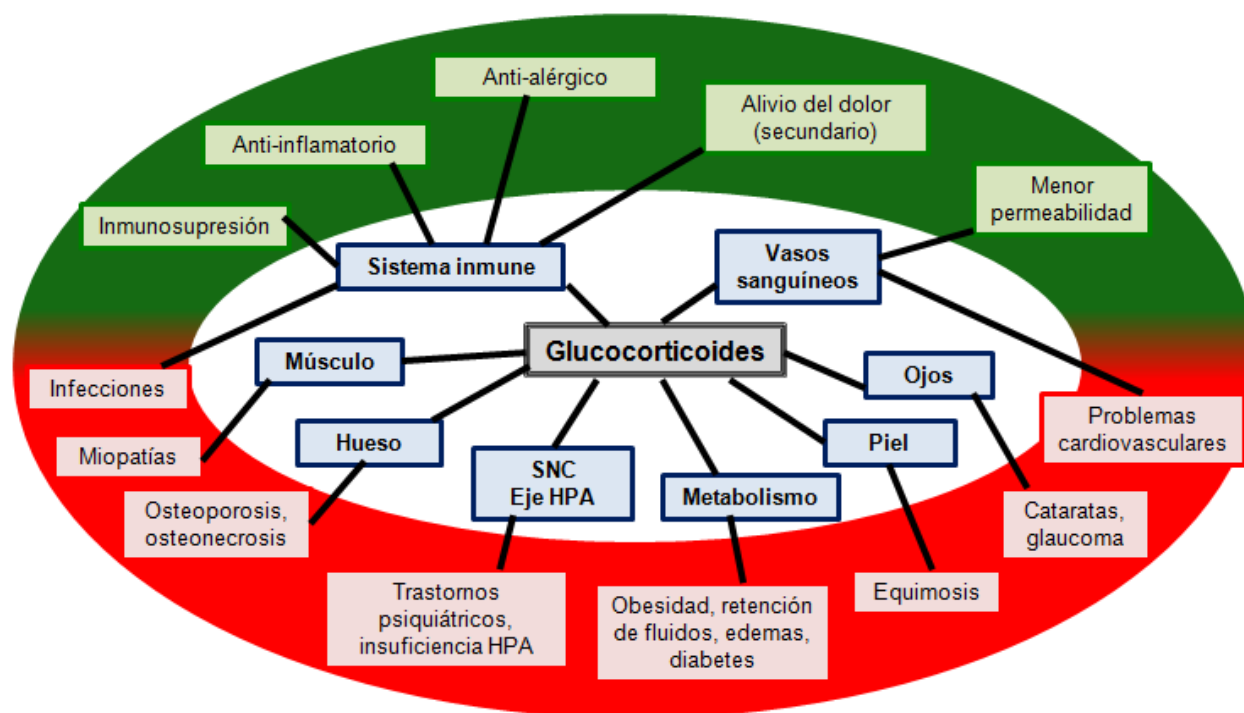


Figura 2.1. Efectos deseados y adversos del uso farmacológico de los glucocorticoides (GC). Los GC actúan sobre diversos órganos y tejidos (marcados en azul), ejerciendo múltiples efectos, ya sea deseados desde el punto de vista terapéutico (marcados en verde) o adversos (marcados en rojo). Modificado de [151].

Lamentablemente, el uso farmacológico de GC conlleva una gran variedad de efectos adversos, que pueden agravarse en casos de tratamientos prolongados o con dosis elevadas. Los efectos en el organismo son similares a los observados en patologías que involucran un exceso de GC endógenos, tales como el síndrome de Cushing [152], e incluyen diabetes, osteoporosis, atrofia de la piel, glaucoma, redistribución de grasa corporal, hipertensión arterial, psicosis, neurodegeneración [143, 144] (Figura 2.1). Estos efectos adversos ocasionados por un exceso de GC endógenos podrían ser tratados mediante antiglucocorticoides, es decir, antagonistas del GR [149, 153]. Sin embargo, los antiglucocorticoides que existen en el mercado, por ejemplo RU486 [136], no son específicos sino que también son antagonistas de otros SR.

Por lo tanto, desde hace varios años numerosos grupos de investigación se han enfocado en el diseño de nuevos fármacos con potencial efecto disociado, es decir, que mantuvieran los efectos deseados o beneficiosos de los GC pero con menor prevalencia de efectos adversos [154].

2.3. Estructura proteica del GR

El GR presenta una estructura modular con tres dominios bien definidos, al igual que el resto de los SR: un dominio N-terminal (NTD) con función de activación (AF-1), un dominio central de unión al ADN (DBD) y un dominio C-terminal de unión a ligando (LBD). Posee además dos señales de localización nuclear (NLS) en la región comprendida entre el DBD y el LBD, y múltiples residuos en los que han sido descritas modificaciones postraduccionales (Figura 2.2).

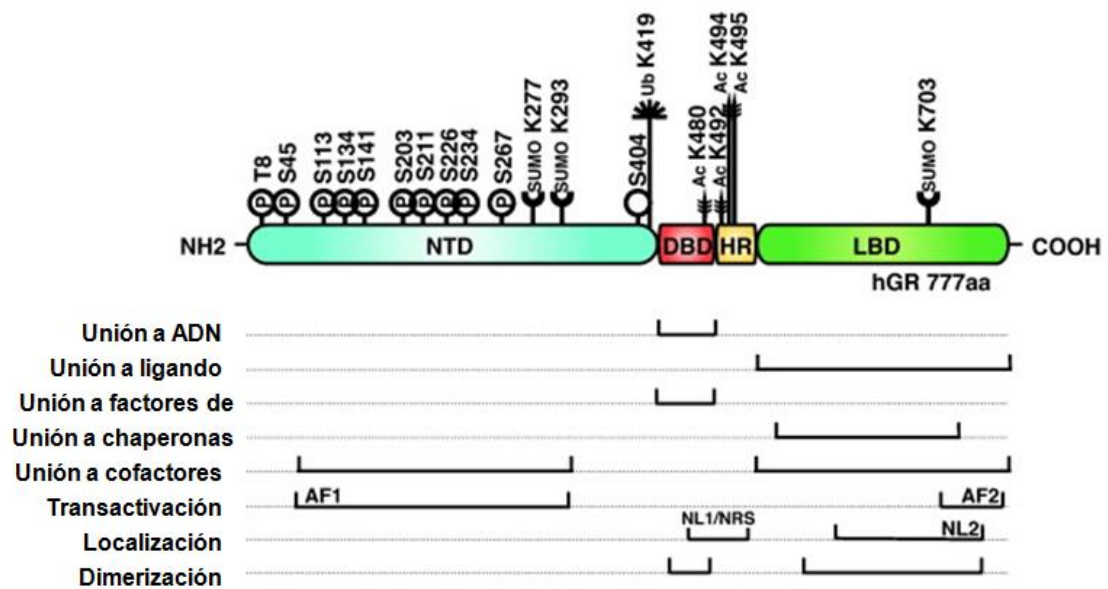


Figura 2.2. Estructura proteica del GR. Estructura modular del GR humano (isoforma α), con sus dominios N-terminal (NTD), de unión al ADN (DBD) y de unión al ligando (LBD). El receptor posee varios sitios de fosforilación, SUMOilación, ubiquitinación y acetilación en los que puede ser modificado postraduccionalmente. Se muestran las distintas regiones del GR responsables de sus funciones y de la interacción con el ADN, ligandos esteroideos y otras proteínas. Modificado de [155].

2.3.1. Dominio N-terminal (NTD)

El NTD presenta una secuencia muy variable entre los distintos receptores nucleares y contiene la región de activación de la transcripción AF-1 [156]. Esta región, independiente de la unión al ligando [157], es responsable de la interacción con cofactores transcripcionales, como

TBP y TFIID, componentes de la maquinaria de transcripción basal [158, 159]. Este dominio no ha podido ser cristalizado aún, probablemente debido a la falta de estructura.

Se propone que el ADN es un modulador alostérico del GR ya que la unión al ADN a través del DBD estabiliza las estructuras secundaria y terciaria del dominio AF-1, regulando su capacidad de unir cofactores de la transcripción [160]. El dominio AF-1 presenta además sitios de fosforilación y SUMOilación involucrados en la actividad y estabilidad de la proteína [161].

2.3.2. Dominio de unión al ADN (DBD)

El DBD es un dominio muy conservado entre los distintos receptores nucleares. La unión al ADN es específica para determinadas secuencias nucleotídicas, denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). El GRE consenso es una secuencia palindrómica, constituida por dos regiones de 6 nucleótidos conservados separadas por tres nucleótidos no conservados (TGTTCTnnnAGAACA). Esta misma secuencia es reconocida también por otros SR [137]. La unión al ADN puede modular alostéricamente la conformación y la actividad del receptor, dependiendo de la secuencia [162].

El GR interactúa con el GRE en forma de homodímero; cada monómero se une a una de las dos secuencias conservadas del elemento palindrómico [163, 164]. Las regiones responsables de la homodimerización pueden funcionar también como regiones de heterodimerización con otros SR, *i.e.* GR-MR [165] o GR-AR [166]. Recientemente, se ha demostrado que la unión al ADN promovería además la interacción de dos homodímeros de GR, formando tetrámeros [167].

El DBD posee dos módulos con motivo estructural de “dedos de zinc” que difieren entre sí en su conformación y función [168]. El segundo módulo contiene un lazo denominado *D-loop*, involucrado en la interacción entre monómeros de GR [169]. Más adelante se describe cómo una mutación puntual en esta región puede afectar notablemente la actividad transcripcional del GR (sección 2.6).

Una región denominada *lever arm* conecta los dos módulos de zinc entre sí y estaría involucrada en el mecanismo alostérico que integra las señales provenientes de la interacción DBD-ADN a otros dominios del receptor [170].

2.3.3. Dominio de unión al ligando (LBD)

El LBD posee un bolsillo hidrofóbico que interactúa con el ligando. Se establecen allí interacciones de tipo puente hidrógeno entre el ligando y los residuos del receptor [171]. Esta cavidad es relativamente flexible ya que algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden reordenarse permitiendo la entrada de grupos voluminosos de determinados ligandos [172].

El LBD contiene una región con función de activación AF-2, cuya conformación varía dependiendo del ligando unido al receptor. La unión de un agonista del GR favorece la interacción con coactivadores de la familia p160, a través de la región AF-2 [173]. A su vez, esta misma región es responsable de la interacción con correpresores del GR [174]. Por otra parte, el LBD presenta dos regiones de dimerización distantes entre sí. Más adelante se describe cómo estas regiones de dimerización pueden ser perturbadas por mutaciones puntuales (sección 2.7) o por unión de ciertos ligandos (sección 2.8.1).

2.4. Activación y mecanismo de acción del GR

La activación del GR involucra una serie de eventos que comienzan en el citoplasma con la unión del ligando al receptor. Posteriormente, el GR transloca al núcleo, homodimeriza y regula la expresión de una gran variedad de genes, ya sea de forma positiva o negativa. Su mecanismo de acción involucra la interacción del complejo ligando-receptor con secuencias *blanco* en el ADN, con correguladores de la transcripción y con otros TF.

Además, se han descripto efectos no génomicos de los GC, de acción más rápida que los producidos por regulación de la expresión génica [175]. Por ejemplo, la interacción del GR con la quinasa JNK [176] y con el receptor de linfocitos T afecta estas vías de señalización [177]. En esta Tesis no se abordaron estos efectos, por lo cual no serán descriptos en detalle.

2.4.1. Unión del ligando y translocación del GR a núcleo

En ausencia de ligando, el GR se encuentra localizado mayoritariamente en citoplasma [178]. La formación de un heterocomplejo con la chaperona Hsp90 mantiene al LBD del GR en una conformación capaz de reconocer al ligando [179, 180] (Figura 2.3). Varias proteínas participan del ensamblado de este heterocomplejo: la chaperona Hsp70, el adaptador Hop e

immunofilinas, entre otras. La formación del complejo involucra la hidrólisis de ATP unido a las chaperonas Hsp90 y Hsp70, y es dependiente de Mg^{2+} [180]. Las immunofilinas son isomerasas que permiten el correcto plegado de varias proteínas [181]. La unión del ligando al receptor da inicio a la translocación del GR del citoplasma al núcleo [182] en el lapso de unos pocos minutos, a través de distintos modelos que se esquematizan en la Figura 2.3.

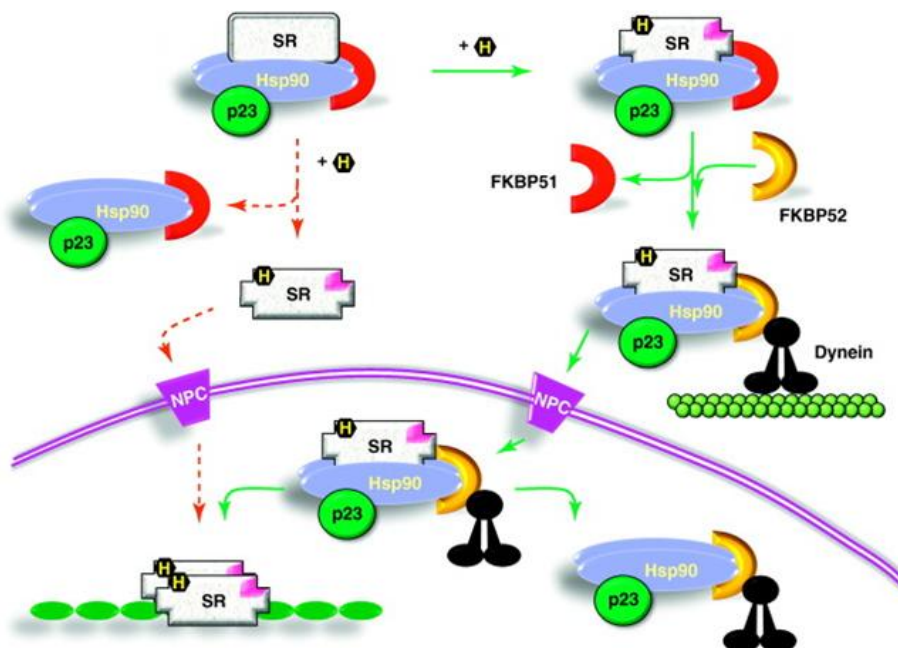


Figura 2.3. Modelos de translocación del GR al núcleo. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la translocación de SR del citoplasma al núcleo. A la izquierda (líneas punteadas rojas), la unión de la hormona libera el complejo de chaperonas y el receptor puede translocar a través del complejo del poro nuclear (NPC). A la derecha (líneas continuas verdes), la unión de la hormona promueve el intercambio de inmunofilinas FKBP51 por FKBP52, que media la interacción con dineína. El SR es transportado vía citoesqueleto y translocado al núcleo junto con el complejo de chaperonas. En ambos mecanismos, se postula que el SR expone la NLS en su conformación unida a ligando. Modificado de [183].

El proceso de translocación del GR al núcleo es aún discutido. Algunos autores proponen que la disociación del heterocomplejo con Hsp90 es necesaria para que el GR exponga su NLS y transloque mediante asociación a importinas [182] (Figura 2.3). Sin embargo, el transporte a través de microtúbulos también mediaría la redistribución espacial del GR. En particular, se ha propuesto que el cambio conformacional inducido por el ligando

promueve una interacción dinámica del GR con el heterocomplejo de chaperonas e inmunofilinas [180]. Además, en el heterocomplejo se produce el intercambio de la inmunofilina FKBP51 por FKBP52, que oficia de puente entre el GR y la dineína, un motor molecular responsable del transporte retrógrado a través de microtúbulos [184, 185]. La interacción entre estos componentes requiere Hsp90, permitiendo la unión del GR a inmunofilinas y por lo tanto a dineína [186] (Figura 2.3).

Las evidencias sugieren que la translocación ocurriría simultáneamente a través de ambos mecanismos celulares. En particular, se ha verificado que el GR puede translocar completamente al núcleo en ausencia de la red de microtúbulos, pero con una cinética muy lenta [187]. Por otra parte, la inhibición de la actividad de Hsp90 tampoco detiene este proceso [184]. La utilización preferencial de una u otra vía podría depender del contexto celular.

El pasaje del GR entre los compartimentos citoplasmático y nuclear ocurre a través del complejo del poro nuclear (NPC). La existencia de dos secuencias NLS en el GR permite la asociación del receptor con importinas, que a su vez interactúan con nucleoporinas presentes en el NPC [181] y permiten la difusión facilitada de la proteína. La exportación desde el núcleo depende de la participación de exportinas que reconocen señales de exportación nuclear [181].

Es importante destacar que los distintos modelos mencionados anteriormente para explicar la translocación nuclear podrían tener distintas implicancias con respecto al mecanismo de pasaje a través del NPC. La disociación del heterocomplejo de chaperonas inducida por ligando es compatible con un modelo de importación mediante importinas asociadas a una NLS. Por otra parte, se ha postulado que el GR puede atravesar el NPC formando parte del heterocomplejo con Hsp90 [181] (Figura 2.3).

2.4.2. Acción del GR

La unión del ligando y la translocación al núcleo integran la etapa de activación del GR. Una vez en el núcleo, regula la expresión génica de forma positiva o negativa, ya sea actuando como TF o regulando la actividad de otros factores. La Figura 2.4 sintetiza los principales mecanismos a través de los cuales el GR puede activar o reprimir la expresión de genes.

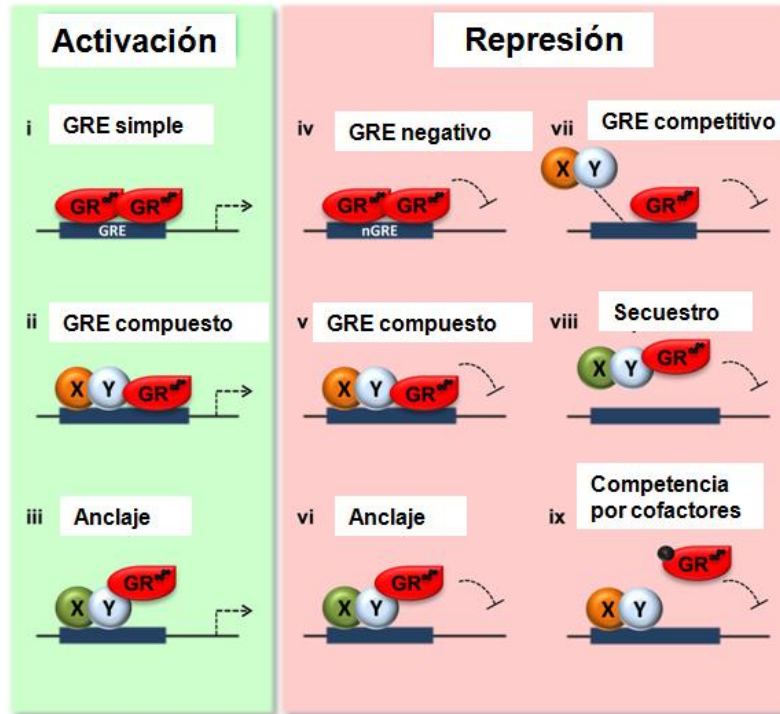


Figura 2.4. Principales modos de acción del GR. El GR activo puede dar lugar a la activación o a la represión de la expresión génica. La activación puede darse por unión directa de GR al GRE (i), en concierto con otros TF (ii) o indirecta anclándose a otros factores (iii). La represión puede darse por mecanismos similares a los mencionados para activación (iv, v, vi) o por unión de GR a un GRE competitivo (vii), secuestro de TF (viii) y competencia por cofactores (ix). X e Y representan otros TF involucrados en la acción del GR. Modificado de [188].

2.4.2.1. GR como factor de transcripción

La actividad del GR como TF depende de la unión directa del receptor a través del DBD a secuencias GRE presentes en sus genes *blanco* (Figura 2.4i). Como se mencionó anteriormente, el GRE consenso es una secuencia palindrómica a la cual se une un homodímero de GR. La activación de la transcripción requiere el reclutamiento de la maquinaria basal transcripcional y de remodeladores de la cromatina [189]. En particular, los factores basales TBP y TFIID interactúan con el dominio AF-1 del GR [158, 159]. CBP y p300 poseen actividad acetiltransferasa de histonas (HAT) e interactúan con el dominio AF-1 e indirectamente con el dominio AF-2, a través de cofactores miembros de la familia p160 como SRC1/NCoA-1 [190]. BRG-1, otro cofactor que también interactúa con GR, remueve la histona H1 de la cromatina, facilitando el acceso de factores basales [191].

En algunos casos, la unión del GR a un GRE no es suficiente para la activación transcripcional de un gen, sino que requiere además la interacción de otros TF u otras moléculas de GR a secuencias adyacentes [192] (Figura 2.4ii). Este modo de acción puede dar lugar también a represión de la expresión génica (Figura 2.4v) [188].

Por otra parte, la unión de GR a elementos de respuesta específicos puede resultar en una regulación negativa de la transcripción. Estas secuencias se denominan GRE negativos (nGRE), para las cuales no se ha encontrado una secuencia consenso conservada [190] (Figura 2.4iv).

2.4.2.2. GR como modulador de otros factores de transcripción

El GR también regula la transcripción de manera indirecta, modulando la actividad de otros TF. Estos procesos no requieren la unión directa del receptor a GRE o nGRE (Figura 2.4iii, vi, viii, ix). NF κ B, AP-1, Oct1/2, STAT5 y CREB son algunos ejemplos de los múltiples TF cuya actividad está regulada por el GR [193, 194]. Esta regulación puede ser positiva o negativa, y depende del contexto celular [194]. Puede ser ejercida por el GR en su estado homodimérico como en su estado monomérico [169].

Se ha postulado que el GR puede ser reclutado indirectamente a genes sin GRE mediante un mecanismo de anclaje a otros TF [195, 196]. El receptor actuaría entonces como un corregulador, promoviendo (Figura 2.4iii) o inhibiendo (Figura 2.4vi) la expresión de genes. Existen evidencias que sugieren distintos tipos de interacción entre el GR y otros TF; éstas podrían ocurrir a través del DBD [194] o de forma indirecta, a través de una proteína puente como nTRip6, la cual participaría en la modulación del GR sobre AP-1 y NF κ B [197]. La regulación positiva de otros factores, como STAT5, dependería del dominio AF-2. En este último caso, el GR actúa como un coactivador [194].

Existen diversos mecanismos propuestos para explicar los casos de represión génica, además del mecanismo de anclaje (Figura 2.4vi). Inicialmente se postuló que el secuestro de TF por parte del GR impediría la unión de los mismos a elementos de respuesta específicos presentes en los genes *blanco* de esos factores [194] (Figura 2.4viii). Otros autores proponen que el GR inhibiría el reclutamiento de coactivadores [198]. La regulación negativa podría incluir la participación de coactivadores del GR como SRC2/NCoA-2 actuando como

correpresores [199] (como se verá más adelante), del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF [200] y de correpresores como las deacetilasas de histonas (HDAC) [194]. La misma competencia por cofactores, que se encuentran en concentraciones limitantes en la célula, puede ser responsable de los efectos represores del GR sobre AP-1 y NF κ B [201, 202] (Figura 2.4ix). Por otra parte, la unión del GR a GRE que se solapan con las secuencias de pegado de otros factores de transcripción puede dar origen a un GRE competitivo, de manera que la unión del GR impide la unión de éstos otros y reprime la expresión génica (Figura 2.4vii) [203, 204].

Es muy probable que no exista un mecanismo universal por el cual el GR inhiba la actividad de otros TF, sino que en cada caso particular intervengan uno o varios de los mecanismos descritos.

2.5. Especificidad y regulación de la acción del GR

En la sección anterior se describieron los mecanismos de acción del GR en un dado contexto celular. Sin embargo, la regulación de estos mecanismos depende de dicho contexto.

La expresión diferencial de distintas isoformas de manera tejido-específica constituye un mecanismo de regulación de la acción de GR [205]. En humano, la isoforma GR α es la más abundante (90% de los transcritos) [206-208].

Por otra parte, el GR es susceptible de ser modificado postraduccionalmente y en consecuencia cambiar su estructura química y su conformación. Estas modificaciones regulan su localización subcelular [161, 209, 210], su estabilidad proteica [210-212] y su actividad transcripcional [212-215]. Entre las modificaciones descritas se encuentran la fosforilación, la acetilación, la ubiquitinación, la SUMOilación y la S-nitrosilación [155, 216-218] (Figura 2.2).

Además, la acción del GR puede ser modulada por la unión de distintos tipos de ligandos, como se verá en la sección 2.8, y por la expresión tejido-específica de una gran variedad de correguladores.

2.5.1. Expresión de correguladores del GR

Los correguladores de la transcripción son proteínas que median la acción de los TF sobre la maquinaria transcripcional, regulando el reclutamiento y el acceso de los diferentes complejos proteicos a la cromatina. Existe una gran variedad de correguladores con funciones diversas que pueden mediar la acción del GR. La regulación espacial y temporal de la expresión de los distintos correguladores constituye un mecanismo relevante de modulación de la acción glucocorticoidea [138, 219].

Los correguladores pueden ser clasificados como coactivadores o correpresores según su función. Los coactivadores pueden tener actividad acetiltransferasa de histonas, metiltransferasa de histonas o de remodelado de cromatina dependiente de ATP, entre otras. Su acción favorece la relajación de la cromatina, facilitando el acceso de la Pol II y otros factores que participan del proceso de transcripción [219]. Existen varias familias de coactivadores que interactúan con el GR. Algunos de ellos lo hacen con el dominio AF-1 del receptor, como el remodelador de la cromatina BRG1 (SWI/SNF) [220, 221] y la acetilasa de histonas P/CAF [222]. Otros, como los coactivadores de la familia p160, se unen al dominio AF-2 del GR [223]. Dentro de esta familia hay tres miembros que comparten ~60% de similitud de secuencias: SRC-1/NCoA-1, SRC-2/NCoA-2 y RAC3/NCoA-3 [224]. En la sección siguiente se profundizará sobre los mecanismos de acción de NCoA-2, un coactivador cuya dinámica se estudió en esta Tesis.

Por otra parte, los correpresores participan en el remodelado de la cromatina, disminuyendo su relajación. Al igual que los coactivadores, funcionan como plataformas de reclutamiento que median la interacción entre el TF específico y los efectores que modifican el estado de la cromatina o interactúan con la maquinaria basal. NCoR y SMRT son dos correpresores relevantes en el mecanismo de acción del GR. Pueden interactuar con el dominio AF-2 del receptor, compitiendo con coactivadores de la familia p160 [174]. Su función como represores parecería residir en su capacidad de reclutar histonas deacetilasas como HDAC3 [225]. De hecho, la función deacetilasa de estas enzimas requiere la interacción con estos correpresores [226]. NCoR y SMRT pueden formar complejos de correpresión diversos, según el contexto celular [227]. Se los ha encontrado asociados, por ejemplo, a componentes de la maquinaria basal de transcripción [228].

2.5.1.1. El coactivador NCoA-2

NCoA-2 (denominado también como SRC-2, TIF2 o GRIP1 según la especie) es uno de los tres miembros de la familia p160 de coactivadores de receptores nucleares. Al igual que el resto de la familia, posee tres motivos LXXLL formando α -hélices, de manera que las lisinas interactúan con residuos no polares del dominio AF-2 del receptor. Estos motivos se encuentran en el dominio central NRID del coactivador [229, 230] (Figura 2.5). La unión de ligandos agonistas favorece una conformación del GR capaz de unir al coactivador [231].

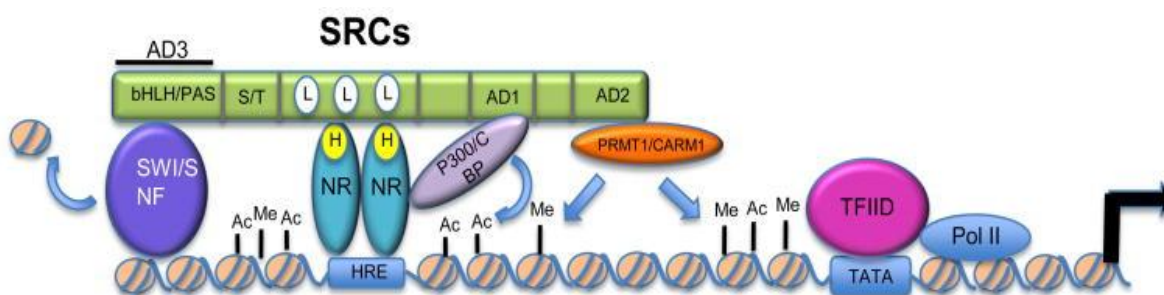


Figura 2.5. Coactivación de receptores nucleares mediada por coactivadores de la familia p160. El reclutamiento del coactivador por receptores nucleares ocurre a través de los motivos LXXLL. El coactivador puede reclutar a su vez coactivadores secundarios a través de sus AD: acetiltransferasas de histonas (p300/CBP), metiltransferasas de histonas (PRMT1, CARM1) y remodeladores de la cromatina (SWI/SNF). Estos coactivadores secundarios son los responsables de actuar sobre la cromatina y la maquinaria transcripcional. Modificado de [232].

NCoA-2 posee dominios C-terminales de activación AD1 y AD2, a través de los cuales se une a las acetiltransferasas de histonas CBP/p300 y pCAF y metiltransferasas de histonas CARM1 y PRMT1 [232] (Figura 2.5), y un dominio N-terminal que favorece su localización nuclear [233] y contiene otra región de activación (AD3) mediante la cual NCoA-2 interactúa con otros coactivadores [232]. Estos coactivadores son enzimas modificadoras de histonas, que a su vez pueden interactuar sinérgicamente con otros coactivadores unidos a los dominios AD1 y AD2 de NCoA-2 [232], o incluso remodelar la cromatina [234] (Figura 2.5).

Los coactivadores de la familia p160 no sólo regulan la actividad de receptores nucleares como el GR sino también la de otros TF. Por ejemplo, pueden interactuar con AP-1 y NF κ B a través de los AD y regular su actividad [232].

Las propiedades de NCoA-2 pueden ser moduladas por múltiples modificaciones postraduccionales [232]. El conjunto de estas modificaciones puede regular su distribución subcelular, su degradación, su interacción con receptores nucleares y su capacidad de reclutar factores que modulan la actividad transcripcional [232].

A diferencia de los otros dos miembros de la familia, NCoA-2 posee también un dominio central de represión (RD), que le confiere la capacidad de favorecer la transrepresión ejercida por el GR de genes dependientes de AP-1 y NF κ B [235]. Esta capacidad de correpresión juega un papel relevante en el efecto anti-inflamatorio de los GC [236]. Se ha observado que el RD participa en la interacción de NCoA-2 con metiltransferasas de histonas [237] y miembros de la familia de factores regulatorios de interferón [238], aunque los mecanismos responsables de la correpresión todavía no se han esclarecido totalmente [236].

NCoA-2 se expresa en diversos órganos y tejidos, con niveles de expresión variables [224]. Ratones KO para NCoA-2 han mostrado una gran disminución en la fertilidad tanto en hembras como en machos [239] y alteraciones en el metabolismo lipídico y balance energético en tejido adiposo [240]. Sin embargo, dada la similitud entre los miembros de la familia, se ha demostrado que también existen mecanismos de compensación. Por ejemplo, en ratones KO para NCoA-1, se describió sobreexpresión de NCoA-2 en cerebro y en testículo, resultando en un fenotipo moderado [241]. Si bien existen vías de señalización específicas para cada uno de los miembros de la familia, en algunos casos pueden cumplir funciones biológicas redundantes [224]. Sin embargo, la mayoría de los ratones KO dobles para NCoA-1 y NCoA-2 no logran sobrevivir después del nacimiento, presuntamente por problemas respiratorios [242]. A diferencia de los otros dos miembros de la familia p160, no se asoció una desregulación de la expresión de NCoA-2 con oncogénesis [232, 243].

2.6. Modelo disociado de acción del GR

A pesar de la compleja red de interacciones que media la acción de los GC, en muchos ámbitos todavía se acepta un modelo extremadamente simplificado definido hace más de dos décadas. Este modelo, llamado “modelo disociado”, establece la existencia exclusiva de dos modos de acción por los cuales el GR actúa. El mecanismo directo, denominado históricamente proceso de *transactivación*, comprende la inducción de la expresión génica como producto de la unión del homodímero de GR a sitios GRE presentes en los promotores de los genes *blanco*.

Por otro lado, en el modo indirecto, denominado proceso de *transrepresión*, el receptor monomérico unido al ligando inhibe la expresión de genes activados por otros TF, como NFκB o AP-1 [244] (Tabla 2.1).

Estado de oligomerización	Dímero	Monómero
Actividad transcripcional	Transactivación	Transrepresión
Mecanismo de acción	Unión directa al ADN en secuencias GRE	Interacción con otros TF
Efectos	Metabólicos (adversos)	Inmunosupresores, anti-inflamatorios (deseados)

Tabla 2.1. Modelo disociado de acción del GR. Resumen de las propiedades estructurales, los mecanismos y los efectos farmacológicos asociados a los dos grandes modos de acción del GR, según el modelo disociado.

El modelo disociado se apoyó principalmente en los resultados obtenidos durante la caracterización del mutante A458T del GR humano (A477T en rata y A465T en ratón [155]), conocido como GRdim [245]. Originalmente, se describió que este mutante es incapaz de transactivar la expresión de genes regulados por secuencias GRE y que esta incapacidad estaría relacionada a su imposibilidad de dimerizar y de unirse al ADN [246], aunque sin embargo conserva su capacidad de transreprimir la expresión de genes regulados por AP-1 y NFκB a través de interacciones con estos TF [246]. En concordancia con estos resultados, se observó en ratones mutantes *knock-in* GR^{dim/dim} que la inducción de genes involucrados en procesos metabólicos se encontraba inhibida, mientras que los efectos inmunomodulares de los GC se conservaban [245, 247].

En ese sentido, desde un punto de vista clínico/farmacológico, se aceptó que los genes regulados por el mecanismo de transactivación estarían asociados a los efectos metabólicos de los GC (clínicamente considerados efectos adversos o indeseables), mientras que los genes regulados por transrepresión se asocian a efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores

(efectos benéficos) [244]. De esta manera, se estableció la idea de que, si una mutación puntual es capaz de producir un cambio en la conformación del receptor que lo hace discriminar entre transrepresión y transactivación, muy probablemente existan ligandos que también logren este efecto [248]. Bajo este supuesto, surgió el concepto de GC disociado: un GC capaz de activar la transrepresión pero no la transactivación del GR. Este ligando mantendría los efectos anti-inflamatorios benéficos pero disminuiría o idealmente eliminaría los efectos adversos, siendo, desde el punto de vista farmacológico, el GC ideal [149].

Con esta premisa, diversos grupos de investigación y la industria farmacéutica se han abocado en la búsqueda de ligandos disociados desde hace más de veinte años. Sin embargo, las evidencias acumuladas muestran que el mecanismo de acción del receptor es mucho más complejo que el descrito por el modelo disociado. Por ejemplo, la transactivación también sería necesaria para los efectos anti-inflamatorios de los glucocorticoides [188, 249], y la transrepresión sería también responsable de ciertos efectos adversos [250].

Por otra parte, trabajos posteriores cuestionaron la supuesta imposibilidad del GRdim de unión al ADN y de transactivación, ya que se demostró que puede inducir la expresión de ciertos genes de manera dependiente del contexto y de la secuencia *blanco* [162, 251, 252]. Además, nuestro y otros grupos de investigación han comprobado que GRdim formaría homodímeros en células vivas, al igual que el receptor salvaje [169, 253].

Considerando que GRdim forma dímeros y que no hay correlación directa entre el estado de oligomerización y la función transcripcional del receptor [169], los resultados obtenidos durante la caracterización de este mutante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, deben ser reinterpretados. La capacidad disminuida de GRdim de inducir la expresión génica puede deberse a otras razones, por ejemplo un menor tiempo de interacción en sus sitios *blanco* en el ADN [254] o una interacción defectuosa con correguladores [162]. En este sentido, se demostró que la mutación *dim* altera el efecto alostérico que ejerce el ADN sobre el GR [162].

2.7. Dimerización del GR y unión al ADN

La homodimerización del GR y la unión al ADN constituyen eventos relevantes en el mecanismo de acción del receptor como TF, aunque todavía no está esclarecido el orden temporal y la interdependencia de estos eventos. Existen evidencias contradictorias que

sugieren que la homodimerización es independiente [255-258] o dependiente [259-261] de la unión del GR al ADN. Estos estudios se realizaron *in vitro*, ya sea con el receptor completo o sólo con el DBD. En el caso de que la homodimerización fuera independiente de la unión al ADN, se encuentra todavía en discusión si esto ocurre en el citoplasma [262] o en el núcleo.

Inicialmente se describió en el GR una interfaz de dimerización en el DBD, en el bucle denominado *D-loop* [260]. Como se explicó previamente, el mutante GRdim presenta una mutación en esta región, y el estudio de su acción biológica significó el principal soporte del modelo disociado de acción del GR [245]. Sin embargo, la descripción de otras dos regiones de dimerización en el LBD [171] permitió demostrar que la homodimerización del receptor es dependiente de múltiples interfaces. La sustitución aminoacídica I634A en el GR de ratón (I628A en humano) interfiere en la interfaz de dimerización presente en la lámina β_A del LBD, disminuyendo la dimerización del receptor *in vitro* [171] e *in vivo* [169].

Recientemente, nuestro grupo verificó que el doble mutante GR^{A465T/I634A} (GRmon), que porta la mutación *dim* en el DBD y otra mutación en la región de dimerización del LBD, no dimeriza [169]. La variante monomérica GRmon presenta intacta su capacidad de transrepresión y comprometida su función de transactivación de la expresión génica [169]. Si bien su capacidad de unirse al ADN se encuentra disminuida, GRmon es reclutado a sitios “pre-programados” de la cromatina, es decir, sitios que se encuentran accesibles antes del tratamiento hormonal [169].

Recientemente, se demostró que la unión a sitios GRE induce la tetramerización del GR [167] si bien la mayoría de las moléculas de GR no unidas al ADN en el núcleo se encuentra en estado dimérico [169]. Este grado de oligomerización mayor se produciría por un cambio conformacional alósterico generado por la unión al ADN, que permitiría la unión de dos dímeros de GR e involucraría al LBD a través de una interfaz diferente a las descritas como regiones de dimerización [167].

2.8. Ligandos sintéticos del GR

Existe una gran diversidad de ligandos sintéticos del GR con diferentes características funcionales. En este trabajo de Tesis, se utilizaron como herramientas dos ligandos sintéticos

del GR: la dexametasona (Dex) y la 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21-OH) (Figura 2.6). A continuación, se detallan las características principales de estos ligandos.

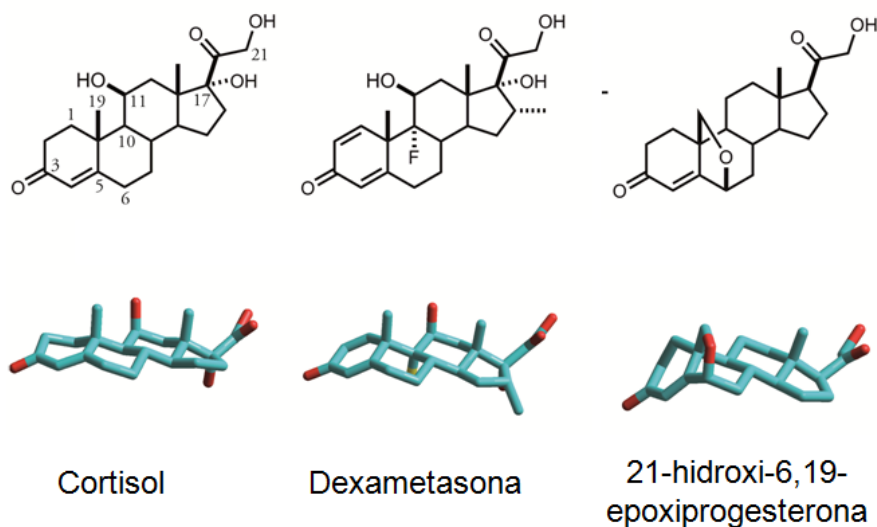


Figura 2.6. Estructura de ligandos del GR. Estructuras del cortisol (ligando endógeno humano) y de dos ligandos sintéticos utilizados en este trabajo de Tesis: dexametasona (agonista completo) y 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (ligando con propiedades disociadas). Modificado de [263].

2.8.1. Dexametasona (Dex)

Dex es uno de los GC sintéticos más utilizados en la clínica. Se caracteriza por presentar potencia y eficacia elevadas y una alta afinidad y selectividad por el GR [264]. Su biodisponibilidad es también elevada y, junto con una lenta metabolización, determina una persistencia por más tiempo en plasma sanguíneo en comparación a los GC endógenos [264, 265]. Además de su uso clínico, se utiliza ampliamente en ensayos *in vivo* e *in vitro* para estudiar los efectos de los GC [265].

Al ser un GC altamente potente y eficaz, Dex es utilizado como un agonista completo del GR, capaz de promover las funciones de transactivación y transrepresión del receptor sobre la expresión génica. Por estos motivos, Dex es un fuerte inmunosupresor y anti-inflamatorio, aunque su uso crónico produce severos efectos adversos típicos de los tratamientos prolongados con GC [266].

2.8.2. 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21-OH)

21-OH es un GC de estructura rígida, diseñado y sintetizado en el laboratorio del Dr. Gerardo Burton (Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA; UMYMFOR, CONICET). La rigidez estructural de esta molécula es aportada por el puente epoxi C₆-C₁₉ y explica la selectividad de este ligando por el GR. Esta selectividad evitaría los efectos adversos observados en la clínica, resultantes de la reacción cruzada de GC que interactúan con otros SR como el PR y el MR; éste es el caso del antiglucocorticoide y antiprogestágeno comercial RU486, que por su estructura flexible presenta afinidad por el GR y el PR [267].

El 21-OH presenta ciertas propiedades antiglucocorticoides cuando es utilizado en presencia de Dex, tanto en cultivos celulares como *in vivo*. En particular, se demostró la capacidad del 21-OH de antagonizar la inducción de genes en presencia de Dex [267, 268]. Además, es incapaz de inducir *per se* la expresión de genes controlados por secuencias GRE [267, 269]. Al mismo tiempo, este ligando presenta propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias similares a un agonista como Dex, aunque con menor potencia [269-271]. Estas evidencias otorgan la posibilidad de utilizar 21-OH clínicamente. A su vez, por sus propiedades de ligando disociado –es decir, con capacidad de promover ciertas respuestas transcripcionales del GR y no otras– constituye una atractiva herramienta molecular para estudiar los mecanismos de acción del receptor.

Mediante simulaciones de dinámica molecular, se observó que la unión de 21-OH provoca diferencias conformacionales en el lazo H1-H3 y en el dominio AF-2 del LBD del receptor, comparando con la unión de Dex. El lazo H1-H3 comprendería una tercera interfaz de dimerización y la unión de 21-OH comprometería la utilización de esta región para formación de dímeros GR/GR [269]. Sin embargo, también se demostró que el GR forma homodímeros aun en presencia de 21-OH y eso sería debido a la existencia de las otras dos regiones de dimerización presentes en el GR [169]. La conformación adquirida por el dominio AF-2 del GR luego de la unión de 21-OH impediría al GR reclutar coactivadores de la familia p160 [269]. En este sentido, se demostró una menor interacción entre el receptor y NCoA-2 cuando el ligando unido a GR es 21-OH comparado con Dex [270]. Estos efectos del 21-OH sobre el GR podrían explicar la incapacidad de este ligando de inducir directamente la expresión génica [272].

Más allá de su uso farmacológico, el uso de ligandos en investigación básica permite estudiar mecanismos moleculares de la acción biológica del receptor, ya que la unión del ligando produciría una conformación particular del GR que modula su acción. Además, a diferencia del uso de mutantes que no existen en la naturaleza, las diferentes conformaciones que adquiere el GR en respuesta a la unión de un determinado ligando tendrían relevancia clínica y su estudio permite profundizar acerca de los mecanismos de acción de estos fármacos.

Introducción:

3. Dinámica de biomoléculas en el núcleo

«Cerré los ojos, los abrí. Entonces vi el Aleph.

Arribo, ahora, al inefable centro de mi relato; empieza, aquí, mi desesperación de escritor. Todo lenguaje es un alfabeto de símbolos cuyo ejercicio presupone un pasado que los interlocutores comparten; ¿cómo transmitir a los otros el infinito Aleph, que mi temerosa memoria apenas abarca? (...) el problema central es irresoluble: la enumeración, siquiera parcial, de un conjunto infinito. En ese instante gigantesco, he visto millones de actos deleitables o atroces; ninguno me asombró como el hecho de que todos ocuparan el mismo punto, sin superposición y sin transparencia. Lo que vieron mis ojos fue simultáneo: lo que transcribiré, sucesivo, porque el lenguaje lo es. Algo, sin embargo, recogeré.

En la parte inferior del escalón, hacia la derecha, vi una pequeña esfera tornasolada, de casi intolerable fulgor. Al principio la creí giratoria; luego comprendí que ese movimiento era una ilusión producida por los vertiginosos espectáculos que encerraba. El diámetro del Aleph sería de dos o tres centímetros, pero el espacio cósmico estaba ahí, sin disminución de tamaño.»

Jorge L. Borges
El Aleph (1949)

En el capítulo 1 se describió que las funciones biológicas nucleares tales como la transcripción, la replicación y la reparación del ADN ocurren en un entorno complejo, compartimentalizado, dependiente de la red arquitectónica que impone la organización jerárquica de la cromatina y de la gran diversidad de cuerpos subnucleares. En este contexto espacial complejo, los diversos componentes que participan de estos procesos deben encontrarse y formar grandes complejos proteicos que interactúan con elementos específicos en el genoma. Estos procesos deben ser eficientes y a la vez finamente regulados. Frente a este panorama, el estudio del comportamiento dinámico de las biomoléculas en el complejo *paisaje* intranuclear no resulta trivial. Se requieren métodos avanzados para realizar experimentos en células vivas y un marco teórico adecuado para interpretar estos datos.

3.1. Métodos de microscopía de fluorescencia en células vivas

El desarrollo de la microscopía de fluorescencia significó un gran avance en el estudio de la dinámica de biomoléculas dentro de la célula y, en particular, dentro del núcleo. La posibilidad de tener una proteína de interés marcada con una etiqueta fluorescente permite detectar específicamente esta molécula en muestras de gran complejidad. Existen distintos métodos para marcar una proteína de interés con un compuesto fluorescente, que involucran la microinyección de proteína purificada y marcada químicamente [273], la expresión de una proteína de fusión con una etiqueta que reacciona con versiones químicamente modificadas de la sonda fluorescente [274] o la expresión de la proteína de interés fusionada a variantes de proteínas fluorescentes [275].

El núcleo es una organela de forma cuasi-esférica, con varios μm de diámetro, por lo cual la obtención de imágenes nucleares requiere de un microscopio que permita una adecuada resolución espacial en z . Para ello, se puede utilizar microscopía confocal [276, 277], de dos fotones [278] o de iluminación laminar [279]. Si bien no se describirán estos métodos en detalle ya que no son el objeto de estudio en esta Tesis, es importante destacar que, con excepción de algunos métodos de superresolución, la resolución lateral (d) (*i.e.* la menor distancia a la cual dos objetos se perciben como entidades independientes) está dada por:

Ecuación 3.1

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

En donde λ es la longitud de onda de la luz y NA es la apertura numérica del objetivo. En condiciones habituales de trabajo, esta ecuación determina que la resolución óptica se encuentre en el orden de 200 nm, aproximadamente [280].

En un microscopio confocal, la capacidad de seccionamiento en z se logra por la inclusión de una apertura confocal (*pinhole*) localizada en el plano conjugado al plano focal del objetivo [277]. Esta disposición define un volumen de observación gaussiano en tres dimensiones del orden del femtolitro [281] y dimensiones radial y axial de ~0.25 y ~1 μm , respectivamente. La adquisición de imágenes en estos microscopios se logra mediante el barrido de la luz de excitación sobre la muestra a través de espejos.

Este microscopio determina que se pueda cuantificar la intensidad de fluorescencia en una región de la muestra con buena resolución espacial (~200 nm) y temporal (μs). La combinación de esta microscopía con detectores de fotones con alta sensibilidad permitió el desarrollo de técnicas para estudiar cuantitativamente la dinámica intracelular de biomoléculas.

A continuación, se detallarán las técnicas de microscopía de fluorescencia más utilizadas para estudiar dinámica: recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP), espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) y seguimiento de moléculas individuales (SMT). Se enfatizará su relevancia en el estudio de interacciones con sitios *blanco* fijos, de acuerdo a nuestro interés por cuantificar interacciones entre biomoléculas y la cromatina en el núcleo de células vivas. Los fundamentos y los tipos de resultados obtenidos en cada técnica se esquematizan en la Figura 3.1.

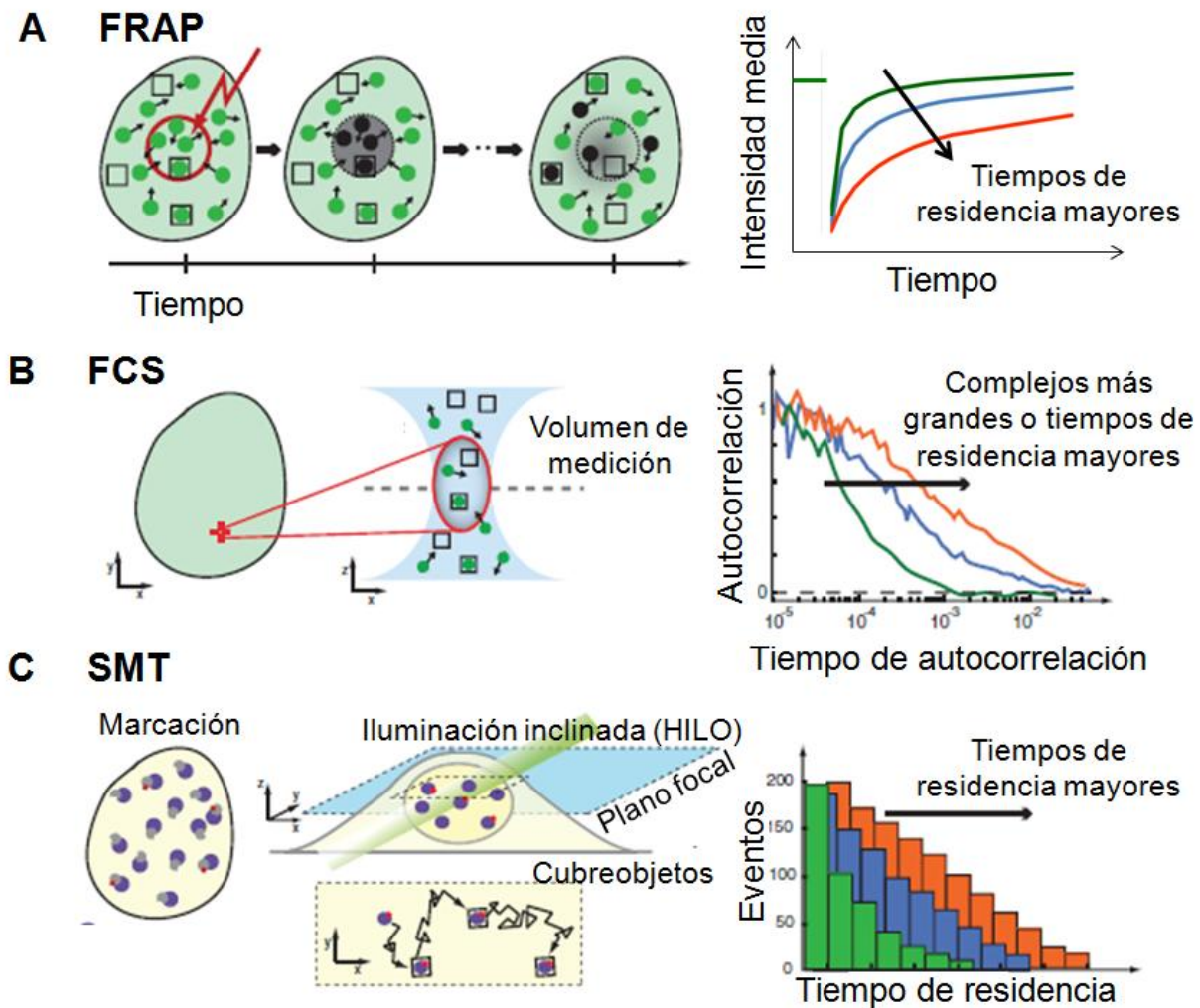


Figura 3.1. Técnicas de fluorescencia para estudiar dinámica de biomoléculas. Los paneles a la izquierda esquematizan los fundamentos de cada método. En todos los casos, se considera que las moléculas (círculos) difunden y tienen cierta probabilidad de interactuar con sitios de unión inmóviles (cuadrados), ubicados en el núcleo celular (representado por una forma cuasi-ovalada). Los paneles a la derecha esquematizan los datos que pueden ser obtenidos de acuerdo a cada método y cómo se evidencian diferencias en los tiempos de residencia de las moléculas en los sitios de interacción. **(A)** Recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP). El círculo rojo representa la región fotoblanqueada. La intensidad en esta zona se recupera en función del tiempo por el intercambio entre las moléculas fluorescentes (verdes) y las blanqueadas (negras). Se computa la intensidad media de fluorescencia en la región blanqueada en función del tiempo. **(B)** Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). Se mide la intensidad de fluorescencia en función del tiempo en el pequeño volumen de observación (óvalo rojo). A partir de las fluctuaciones de intensidad debido al intercambio de moléculas fuera y dentro de este volumen de observación, se computa la función de autocorrelación que describe esta dinámica. **(C)** Seguimiento de molécula individual (SMT). Estos métodos utilizan diversas estrategias para marcar una pequeña subpoblación de las moléculas con etiquetas fluorescentes, las cuales son detectadas individualmente en microscopios que permiten seccionamiento óptico tales como microscopía de iluminación inclinada (HILO). Se obtienen las trayectorias de moléculas individuales y se computa un histograma de tiempos de unión a sitios inmóviles. Modificado de [282].

3.1.1. Recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP)

FRAP se basa en el fotoblanqueo irreversible de las moléculas fluorescentes en una subregión de interés mediante la irradiación con altas potencias de láser y el seguimiento de la evolución temporal de la fluorescencia en esta región [283, 284]. El intercambio dinámico de moléculas entre la subregión fotoblanqueada y los alrededores permite el reemplazo gradual de las moléculas fotoblanqueadas por moléculas fluorescentes y por lo tanto la recuperación de la intensidad de fluorescencia en esta subregión [284] (Figura 3.1A).

La evolución temporal y espacial de la recuperación de fluorescencia en la subregión fotoblanqueada depende de la movilidad de las moléculas fluorescentes, incluyendo posibles interacciones con otras biomoléculas en su microentorno que puedan afectar su movimiento. Las curvas de recuperación se pueden analizar cuantitativamente mediante modelos matemáticos, para obtener parámetros de movilidad [285]. FRAP es un método muy utilizado debido a la simplicidad en su instrumentación y a que el análisis cualitativo de los datos brinda información sencilla sobre la dinámica estudiada [282]. Sin embargo, posee varias limitaciones. En particular, la técnica presenta baja resolución temporal y espacial, y requiere de una relativamente alta concentración de la biomolécula fluorescente, por lo que puede haber artefactos derivados de la sobreexpresión [282]. Además, la irradiación de la muestra con un láser de alta potencia puede producir daño celular [286] y alterar la dinámica intranuclear de proteínas [287].

3.1.2. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

Las técnicas derivadas de FCS se basan en coleccionar una traza temporal de intensidad de fluorescencia en un volumen pequeño de la muestra y analizar cuantitativamente las fluctuaciones de fluorescencia. Este tipo de experimentos puede entonces realizarse utilizando microscopios confocales o de excitación multifotónica.

Uno de los procesos que puede introducir fluctuaciones en la traza temporal de intensidad es el movimiento de moléculas fluorescentes que salen y entran del volumen de observación [288] (Figura 3.1B). Uno de los procedimientos utilizados para cuantificar la movilidad de las moléculas a partir de la traza de intensidad es calcular la función de autocorrelación (sección 5.11.3), que evalúa el grado de similitud entre la intensidad de fluorescencia a un dado tiempo y la intensidad a un tiempo posterior (tiempo de retardo). Si las

moléculas permanecen por más tiempo en el volumen de observación, ya sea por ejemplo porque difunden lentamente o porque interactúan con sitios inmóviles, la correlación se mantiene por tiempos de retardo mayores.

Las curvas de autocorrelación pueden ser interpretadas según modelos que consideren los distintos procesos que causan las fluctuaciones [289, 290]. Como se desarrollará más adelante, FCS puede implementarse en modo de adquisición en un punto, a lo largo de una línea [291] o en una imagen entera [292]. Otra variante de la técnica es la espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS), que permite analizar las interacciones entre dos biomoléculas fluorescentes separadas espectralmente, a partir del cálculo de funciones de correlación cruzada (sección 5.11.3).

En contraste al método de FRAP, FCS posee alta resolución temporal ($\sim\mu\text{s}$) y espacial ($\sim 200\text{ nm}$), es una técnica no invasiva (no se requieren altas potencias de láser) y requiere bajas concentraciones de moléculas fluorescentes ($\sim\text{nM}$). Como analizaremos más adelante, las mediciones de fluctuaciones de intensidad permiten además determinar concentración y estado de oligomerización [293]. Si bien por su alta resolución temporal es posible detectar eventos muy rápidos [294], su capacidad para estudiar eventos muy lentos y poco frecuentes está limitada por la estadística, el fotoblanqueo y el movimiento de la célula y el núcleo [282].

Se han diseñado diversos métodos para estudiar la dinámica de biomoléculas en células vivas basados en correlación de fluorescencia, como RICS (*Raster Image Correlation Spectroscopy*) [295], STICS (*Spatiotemporal Image Correlation Spectroscopy*) [292, 296] y pCF (*pair Correlation Function*) [297-299]. Estos métodos involucran el cálculo de correlaciones espacio-temporales entre píxeles distintos de una imagen, de manera que permiten analizar la comunicación entre distintas locaciones y detectar la existencia de barreras u obstáculos al movimiento de moléculas. En este sentido, permiten realizar un mapeo espacial de la dinámica intracelular de biomoléculas. El desarrollo de equipamiento con detección de mayor sensibilidad y mayor resolución temporal seguramente contribuirá a ampliar el uso de estas técnicas en los próximos años.

3.1.3. Seguimiento de molécula individual (SMT)

Tanto FRAP como FCS brindan información sobre el comportamiento promedio de las moléculas estudiadas en una dada región. A diferencia de estos métodos, el seguimiento de moléculas individuales (SMT) se basa en la detección de moléculas fluorescentes individuales, su localización con precisión nanométrica y la obtención de sus trayectorias espaciales en el tiempo [300] (Figura 3.1C). Las moléculas individuales se visualizan en las imágenes como puntos limitados por difracción, de manera que pueden ser localizados en cada imagen por rutinas de ajuste normal [301]. Luego se establecen criterios para vincular a las partículas localizadas en imágenes consecutivas entre sí, de modo de obtener trayectorias de moléculas individuales [301].

Por este motivo, la concentración de moléculas fluorescentes debe ser baja ($<nM$) [300]. SMT usualmente requiere microscopías que permitan la observación de un único plano de la muestra para minimizar la colección de luz proveniente de moléculas localizadas en planos distintos al focal. Los microscopios de iluminación altamente inclinada (HILO) (Figura 3.1C), de reflexión total interna (TIRF) o de iluminación laminar (SPIM) cumplen estos requerimientos [300]. En estos microscopios es fundamental utilizar cámaras con alta sensibilidad y rapidez dado que estas propiedades determinan la capacidad de detección y seguimiento de moléculas individuales [300].

Uno de los requerimientos de estos métodos es que los fluoróforos deben tener un brillo molecular alto y buena fotoestabilidad, por lo que no se suelen usar proteínas fluorescentes sino sondas sintéticas fluorescentes que se unen covalentemente a la molécula de interés. Para ello se utilizan diversas estrategias tales como el sistema HaloTag [302], en donde se utiliza la proteína de interés fusionada a la enzima modificada de origen bacteriano HaloTag. Esta enzima tiene la capacidad de unir covalentemente determinadas sondas orgánicas fluorescentes, que son permeables en la célula [302]. La marcación de la proteína de interés puede realizarse de manera rápida y específica, y la concentración de moléculas fluorescentes puede ser manipulada con precisión.

El análisis de las trayectorias de moléculas individuales generalmente involucra identificar eventos de difusión y eventos en los cuales la molécula se mantiene confinada en una región muy limitada. Estos últimos eventos se asignan habitualmente a eventos de unión a sitios *blanco* prácticamente fijos; el área de confinamiento está dada por el movimiento local del

sitio y el error en la determinación de la posición de la molécula. El tiempo en que una molécula permaneció confinada es su tiempo de residencia en el sitio de unión [303].

SMT, a diferencia de FCS, permite capturar eventos lentos y poco frecuentes. Sin embargo, su resolución temporal es baja, por lo que se pierde la detección de los eventos más rápidos.

3.2. Influencia de la topología intranuclear en la dinámica de biomoléculas

Como se explicó en el capítulo 1, los procesos biológicos nucleares como la transcripción ocurren en un ambiente complejo debido al alto *crowding* macromolecular, a la organización arquitectónica de la cromatina en diferentes niveles de jerarquía y a la existencia de múltiples subcompartimentos que concentran distintas biomoléculas y favorecen determinadas interacciones. En este sentido, la geometría interna del núcleo restringe espacialmente la movilidad intranuclear de las biomoléculas, con consecuencias en las interacciones bioquímicas que gobiernan las funciones biológicas nucleares [304].

Se estima que la exclusión debido a la presencia de grandes complejos macromoleculares como la cromatina reduce apenas un 10-20% el volumen accesible a biomoléculas respecto del volumen nuclear total [304]. Sin embargo, esta estimación no contempla la compleja geometría intranuclear. Dado que la cromatina se empaqueta de manera jerárquica en distintos niveles de organización, varios autores han propuesto que la cromatina posee una estructura fractal [305, 306]. Esta propiedad impondría una exclusión del volumen nuclear que depende del tamaño de la partícula y de la dimensión fractal (es decir, cuán fractal es la cromatina) [304]. Otros autores han propuesto que la compactación misma de la cromatina genera un sistema de canales que favorece ciertas vías de movilidad y restringe la comunicación entre otras regiones, funcionando como barreras u obstáculos [298, 307]. Estas barreras pueden construir trampas en las que moléculas de determinado tamaño pueden quedar atrapadas [307].

Los estudios de dinámica intranuclear de moléculas supuestamente inertes muestran desviaciones de lo esperado para una difusión libre browniana, dando lugar a un comportamiento anómalo o subdifusivo. Experimentalmente se evidencia que el desplazamiento cuadrático medio (MSD) de sondas inertes es menor al esperado por difusión

libre y la diferencia es mayor a tiempos más largos (Figura 3.2). En el núcleo, sin embargo, Di Rienzo y col. observaron que el comportamiento subdifusivo se evidencia incluso a escalas espacio-temporales muy cortas [308].

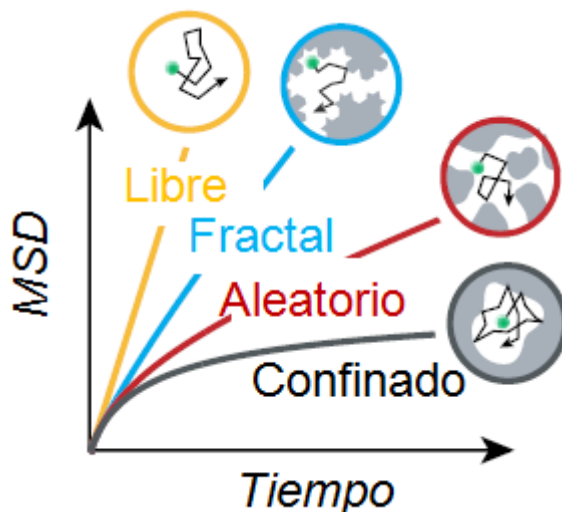


Figura 3.2. Influencia de la topología intranuclear en la movilidad de biomoléculas. El desplazamiento cuadrático medio (MSD) describe cuánto se mueve una partícula en relación a una posición inicial, en función del tiempo. En ausencia de obstáculos, la difusión es libre (naranja) y el MSD sólo depende del coeficiente de difusión. La presencia de obstáculos genera comportamientos anómalos, subdifusivos (el MSD es menor al esperado por difusión libre). Los obstáculos pueden estar distribuidos en una geometría fractal (celeste), al azar (rojo) o formando corrales que confinan el movimiento de las partículas (negro). En este último caso, el MSD no crece indefinidamente en función del tiempo sino que alcanza un valor límite, según las dimensiones del corral. Modificado de [307].

La anomalía en la difusión ha sido interpretada por algunos autores de acuerdo a la fractalidad de la cromatina [305, 309] (Figura 3.2). Por el contrario, Baum y col. [307] no conciben el entorno nuclear como un espacio fractal sino como un medio poroso multi-escala formado por obstáculos distribuidos al azar (Figura 3.2). En ese mismo trabajo, los autores muestran que la viscosidad intrínseca del nucleoplasma es muy similar a la del agua. A mayor escala, empieza a ser relevante la porosidad del medio, que depende del tamaño y la forma de las proteínas difusivas. Así, proteínas chicas tienen acceso a una superficie de exploración mayor debido a que pueden visitar poros más chicos [307]. Esta particular arquitectura porosa que restringe la movilidad de las biomoléculas según su forma y tamaño está principalmente dada por la estructura de la cromatina [307].

Por otra parte, es necesario aclarar que los estudios descriptos en esta sección para analizar la geometría interna del núcleo asumen que las sondas fluorescentes utilizadas son totalmente inertes y que la red de obstáculos que define esta geometría (*i.e.* la cromatina) es inmóvil. Sin embargo, nunca se demostró que sondas como GFP sean realmente inertes. Por otro lado, la cromatina y otras estructuras nucleares presentan agitación térmica, aunque están restringidas por la arquitectura del núcleo [310-312]. En experimentos de SMT se observó que histonas nucleosomales unidas a la cromatina exploran una región confinada de 55-180 nm en la escala temporal de 1-10 s [303, 313].

3.3. Influencia de las interacciones intranucleares en la dinámica de biomoléculas

La geometría del núcleo impone un marco de restricciones a la movilidad de biomoléculas que difunden en el nucleoplasma. Sin embargo, la dinámica de moléculas inertes no representa el comportamiento de las moléculas de interés biológico, para las cuales la ejecución de sus funciones implica la interacción con diversos componentes nucleares, entre ellos el ADN, el ARN y/o cuerpos subnucleares. De hecho, no hay una correlación entre el tamaño de las proteínas y su movilidad en el núcleo [314-316], por lo que la geometría intranuclear no determina por sí sola la dinámica de las proteínas dentro de esta organela. De esta manera, las interacciones entre las moléculas que difunden y, fundamentalmente, entre estas moléculas y la superficie de la cromatina contribuyen a reducir notablemente la movilidad de las mismas [303, 316, 317].

Por lo tanto, resulta relevante detectar y caracterizar cuantitativamente las interacciones entre las proteínas y el ADN. Esto puede realizarse mediante la determinación de las constantes de asociación y de disociación *in vivo* [318].

Una de las técnicas más utilizadas para caracterizar estas interacciones es FCS. En estudios iniciales en los cuales se exploró la dinámica de TF en el núcleo, las curvas de autocorrelación de fluorescencia se ajustaron según un modelo que consideraba dos componentes difusivos: un componente rápido para las moléculas libres y otro lento para las unidas [319-321].

Michelman-Ribeiro y col. profundizaron en el análisis teórico de este escenario y derivaron un modelo de “difusión y unión” para estimar la constante cinética de disociación (k_{off})

y la constante cinética aparente de unión (k_{on}^*) involucradas en la interacción con sitios fijos (como la cromatina) a partir de datos de FCS [290]. La constante de asociación verdadera k_{on} no es accesible pero sí la pseudoconstante de asociación k_{on}^* , que depende del número de sitios libres en el equilibrio S_{eq} ($k_{on}^* = S_{eq} k_{on}$) [314]. El modelo asume que S_{eq} tiene un valor elevado (respecto del número de sitios ocupados) y constante.

Si bien el modelo no tiene solución analítica, ciertas condiciones de contorno permiten reducir este modelo completo a soluciones simplificadas. En particular, cuando el tiempo característico difusional es más corto que el tiempo de asociación con el sitio de unión, es posible utilizar un régimen simplificado denominado “reacción dominante”. En esta condición, el coeficiente de difusión, k_{off} y k_{on}^* pueden ser determinados de forma independiente [290] (sección 5.11.5). La determinación de las constantes de asociación y disociación brinda información relevante acerca de la dinámica y la distribución de la proteína estudiada. La fracción de moléculas unidas a los sitios en el equilibrio (C_{eq}) puede calcularse como $C_{eq} = k_{on}^*/(k_{off} + k_{on}^*)$ [290]. Por otra parte, $1/k_{on}^*$ representa el tiempo promedio que tarda una proteína en encontrar un sitio de unión y $1/k_{off}$ representa el tiempo de residencia promedio de la proteína en el sitio de unión [282].

3.4. Dinámica intranuclear de factores de transcripción

Como se mencionó previamente (sección 1.3.2), un aspecto que modula la transcripción es la compartimentalización espacial de las moléculas que intervienen en este proceso. A su vez, la transcripción también es modulada por el comportamiento dinámico de estos actores. Por este motivo, las siguientes secciones se enfocarán en la dinámica de los TF.

3.4.1. Interacciones entre TF y la cromatina

Los TF exhiben en general una dinámica relativamente rápida de interacción con la cromatina [322]. Se han detectado interacciones entre los TF y el ADN en un rango temporal amplio que abarca desde segundos a minutos [282]. Esto llevó a discutir la relevancia biológica de las interacciones detectadas por microscopía de fluorescencia. En particular, se postuló que aquellas interacciones más lentas correspondían a interacciones específicas mientras que se asignó a las interacciones rápidas como inespecíficas [282].

Lamentablemente, la distinción experimental entre los dos tipos de sitios no es simple. Algunos autores han argumentado que en ensayos de microscopía en posiciones aleatorias dentro del núcleo los sitios inespecíficos se encuentran en exceso, y por lo tanto son mayoritariamente representados [314, 323]. En cambio, otros autores han establecido correlaciones entre tratamientos experimentales y cambios en la dinámica de TF para apoyar la idea de que predominan las interacciones específicas [320, 324]. Varios autores han llegado a la conclusión de que ambos tipos de interacciones contribuyen a la dinámica medida [315, 325, 326], sin embargo son pocos los trabajos que han intentado responder esta pregunta, y lo abordan mediante mutaciones que puedan disociar la unión específica e inespecífica al ADN [303, 327]. De todos modos, Normanno y col. [328] mostraron que existe una amplia distribución de tiempos de residencia característicos de interacciones inespecíficas y que no se puede establecer una clara delimitación entre ambos tipos de interacciones simplemente en base a la duración de los eventos de unión.

Mueller y col. [282] plantean que la partición de un TF entre los conjuntos de sitios inespecíficos y de sitios específicos tiene consecuencias en la actividad transcripcional, y que esta partición puede ser modulada mediante la variación de los tiempos de residencia característicos en cada tipo de sitio, por ejemplo por acción de chaperonas, el proteasoma y remodeladores de la cromatina [329, 330]. Por otro lado, un mayor tiempo de residencia de un TF en un promotor estaría asociado a una mayor respuesta transcripcional [329, 331, 332].

3.4.2. Interacciones específicas entre TF y la cromatina

Más allá de la distinción entre interacciones específicas e inespecíficas, el tiempo de residencia característico de los TF en sus secuencias *blanco* sigue siendo materia de debate. Tradicionalmente, se consideraba que los TF establecían interacciones estables con los promotores, del orden de horas, a partir de experimentos realizados *in vitro* [333]. Por lo contrario, los experimentos de dinámica de fluorescencia, como FRAP, demostraron que existe un intercambio mucho más rápido, del orden de segundos [334-336].

De todos modos, los datos de la literatura muestran una gran variedad de tiempos de residencia para TF, lo cual indicaría que este tipo de interacciones depende del TF y del contexto celular [282, 303, 337].

3.4.3. Interacciones inespecíficas entre TF y la cromatina

Se ha propuesto que las interacciones más rápidas se relacionan con el proceso de búsqueda de un TF de sus secuencias *blanco*. Dentro de estas interacciones se destacan la difusión unidimensional a lo largo de la cadena de ADN (*sliding*) y los saltos entre cadenas de ADN adyacentes (*hopping*) [338]. Estos procesos aceleran el muestreo de sitios en la cromatina en comparación al tiempo de búsqueda calculado si el TF sólo pudiera difundir en el nucleoplasma, ya que cada evento de unión inespecífica implica el muestreo de múltiples sitios [339]. El tiempo de búsqueda finalmente depende tanto del tamaño del genoma como de la concentración nucleoplásmica de los TF [282].

La asociación inespecífica de TF a la cromatina o a complejos proteicos no sólo permite la exploración de esta superficie por *sliding*, que constituye un caso de difusión facilitada [340-342], sino que también puede a su vez causar cambios conformacionales de la superficie de adsorción (*i.e.* la cromatina) o de la proteína [343]. El TF no sólo debe explorar espacialmente sitios de la cromatina sino también explorar conformaciones proteicas y esto puede ser un factor limitante en la tasa de transcripción [304]. De hecho, ~90% de las moléculas de Pol II que logran unirse al promotor fallan en la elongación [344].

Woringer y col. [304] definen dos tipos extremos de exploración del núcleo por parte de los TF: compacta y no compacta [345], esquematizados en la Figura 3.3.

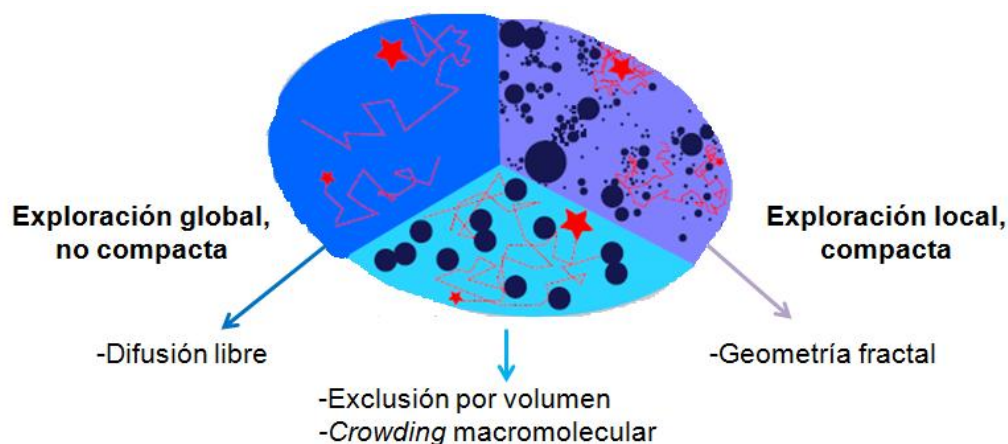


Figura 3.3. Patrones de exploración de TF en el núcleo. Se representan distintos tipos de exploración espacial del núcleo, según la red de obstáculos a la que se enfrenta el TF. En los casos extremos, los TF pueden exhibir una exploración global, no compacta, con difusión libre o una exploración compacta, local, dependiente de una red fractal de obstáculos. En casos intermedios, puede haber obstáculos a distintas escalas espaciales y se pueden evidenciar fenómenos de exclusión por volumen y *crowding* macromolecular. Modificado de [304].

En la exploración compacta, una molécula realiza una trayectoria recurrente, muestreando múltiples veces un mismo lugar [345]. Este tipo de exploración está restringida por la fractalidad de la superficie exploratoria [316] y generaría una acumulación local del factor en ciertas regiones, regulando procesos dependientes de la concentración [304]. Este fenómeno se relaciona con la organización del genoma en distintos microentornos nucleares con determinadas características regulatorias, como se detalló en el capítulo 1. El fenómeno de exploración compacta es compatible también con el ensamblado dinámico y estocástico de la maquinaria transcripcional [91, 346], ya que requiere una exploración local y recurrente de los actores involucrados.

Por otra parte, una exploración no compacta sería característica de proteínas que cumplen un rol global en el genoma, tales como c-Myc [316], un factor TF general que tiene la capacidad de regular la transcripción de prácticamente todos los genes [347]. El tipo de exploración estaría gobernado por el *paisaje* de interacciones a las que se enfrenta cada TF [316]. Es decir, distintos TF pueden ser afectados de diferente manera por la misma arquitectura intranuclear, ya que cada factor puede interactuar con distintos sitios presentes en el genoma.

3.5. Distribución y dinámica intranuclear del receptor de glucocorticoides

El desarrollo de diversas técnicas de microscopía ha permitido estudiar la distribución espacial del GR dentro de la célula y particularmente dentro del núcleo, su movilidad y su interacción con distintos componentes subnucleares. Como se verá en las secciones siguientes, la organización espacial y la dinámica del GR se encuentran íntimamente relacionadas.

3.5.1. Formación de *foci* subnucleares de GR

En el capítulo 1, se describió al núcleo como una organela compleja organizada en múltiples subcompartimentos cuyos componentes presentan un intercambio dinámico.

En este sentido, la distribución subnuclear del GR no es homogénea, sino que se concentra en 1000-2000 *foci*, con decenas de moléculas de GR por *focus* [348]. Esto se ha observado tanto por inmunodetección del receptor endógeno en líneas celulares e *in vivo* [348], como en células sobre-expresando transitoriamente el GR [270, 349, 350]. La acumulación en *foci* es un fenómeno comúnmente observado en estudios de otros TF [4, 351, 352] y especialmente en otros SR [353-356].

El rol que cumplen estos *foci* de GR todavía está en discusión. Inicialmente se ha propuesto que correspondían a fábricas de transcripción pero se observó un bajo nivel de colocalización con los *foci* de Pol II y sitios de transcripción activa [348, 352]. Tampoco colocalizan con el factor de *splicing* SC-35 [348], un marcador distintivo de los *speckles*, que concentran una gran cantidad y variedad de factores de *splicing*.

Schaaf y col. exploraron algunos aspectos de la capacidad del GR de formar *foci* [349]. En este trabajo, hallaron que ligandos con mayor afinidad por el GR favorecen conformaciones del receptor con una mayor capacidad de reclutamiento a los *foci*. Además, observaron que la distribución en *foci* es estable en el tiempo pero presentan un recambio dinámico de moléculas de GR. De todos modos, la movilidad del receptor es menor en estos dominios focales que en el nucleoplasma.

Desde su descripción hace más de dos décadas, no se ha esclarecido la naturaleza estructural ni la función biológica de los *foci* formados por el GR en el núcleo. Hay pocas

respuestas y muchas preguntas abiertas para explorar este aspecto de la distribución espacial del receptor.

3.5.2. Dinámica intranuclear del GR

El desarrollo de técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia en células vivas ha permitido estudiar la dinámica del GR dentro del núcleo y sus interacciones con la cromatina. El hecho de ser un TF con capacidad de unirse a decenas de miles de sitios en el genoma, ya sea de forma directa o indirecta, y la posibilidad de modular su actividad mediante estimulación hormonal convirtieron al GR en un sistema modelo en el estudio de la dinámica intranuclear de TF.

Como se mencionó previamente, hasta hace dos décadas se consideraba que las interacciones entre los TF y sus secuencias *blanco* eran prácticamente estáticas. En experimentos *in vitro*, Perlmann y col. determinaron un tiempo de residencia >1 h para el GR en el promotor MMTV [333]. Sin embargo, el uso pionero de FRAP entre las técnicas de dinámica de fluorescencia permitió a McNally y col. detectar una interacción mucho más rápida entre GR y sus elementos de respuesta *in vivo*, del orden de segundos [334]. Estudios de este tipo llevaron a proponer un modelo de “*hit and run*” para la unión de los TF al ADN. En este sentido, el estudio de la dinámica del GR ha escrito páginas importantes en la literatura referida a la dinámica del proceso de transcripción.

A partir de estudios de FRAP, Schaaf y col. observaron que la adición de ligandos de alta afinidad como Dex reduce la movilidad del GR dentro del núcleo [357] y favorece la formación de *foci* subnucleares [349]. El uso de FRAP permitió estudiar la influencia de mutaciones y ligandos en la movilidad del receptor y se determinaron tiempos medios de recuperación del orden de 1-2 s [349, 357-360].

Al momento del inicio de esta Tesis, existían unos pocos trabajos en los que se utilizó FCS para estudiar la dinámica del GR [320, 323]. Por otra parte, en los últimos años se publicaron varios trabajos en los cuales se usa SMT para detectar eventos individuales de unión de moléculas de GR a la cromatina [254, 360-362]. En el capítulo 9 se discutirán los resultados obtenidos en esta Tesis y las similitudes y discrepancias que existen con los resultados publicados en los años recientes.

Además, en la mayoría de los trabajos encontrados en la literatura, los autores han evaluado ya sea la movilidad intranuclear del GR o su distribución subnuclear en *foci*, sin tener en cuenta que estos dos aspectos del mecanismo de acción del receptor podrían estar relacionados. La manera en que el GR se mueve dentro del núcleo, su participación en una gran diversidad de interacciones con componentes estáticos como la cromatina y su distribución espacial heterogénea en diferentes subcompartimentos forman parte de un mismo proceso: la organización dinámica del GR dentro del núcleo, el cual es objeto de estudio en esta Tesis.

4. Objetivos

De acuerdo a los antecedentes presentados en los tres capítulos de la Introducción, se planteó como hipótesis que la distribución y la dinámica intranucleares del GR podrían ser aspectos relevantes en el mecanismo de acción del receptor, afectando su actividad como regulador de la expresión génica. En este sentido, un enfoque biofísico involucrando técnicas de microscopía de fluorescencia en células vivas permitiría explorar estos aspectos.

Dado que existen distintos ligandos y mutantes del GR que generan conformaciones del receptor que presentan distintas actividades transcripcionales, también se postuló que el uso de estos ligandos y mutantes podría constituir una herramienta para examinar si existe cierta correlación entre la distribución y la dinámica intranucleares del GR y su actividad transcripcional.

A su vez, dada la relevancia de coactivadores de la familia p160 en la función de los receptores nucleares, se postuló si la interacción con el coactivador NCoA-2 podría estar influir en la distribución y la dinámica intranucleares del GR.

En base a estas hipótesis de trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Analizar la distribución espacial y la dinámica intranucleares del GR y de NCoA-2, y su capacidad de interactuar con la cromatina.
- 2) Analizar las interacciones entre GR y NCoA-2 en el núcleo, y evaluar si estas interacciones afectan la distribución y la dinámica intranucleares de ambas proteínas.
- 3) Estudiar la influencia de la conformación del GR en la distribución y la dinámica intranucleares del receptor y en su capacidad de interactuar con NCoA-2.

5. Materiales y métodos

5.1. Esteroides

La dexametasona (Dex) fue adquirida en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Se preparó una solución madre 1000X (10 ó 100 μ M, según corresponda) en etanol y se conservó a -20°C. La 21-hidroxi-6,19 epoxiprogesterona (21-OH) fue sintetizada por la Dra. María Virginia Dansey en el laboratorio dirigido por el Dr. Gerardo Burton [363]. Se preparó una solución madre 1000X (10 mM) en dimetilsulfóxido y se conservó a -20°C.

5.2. Cultivo celular

Las líneas celulares BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), derivada de fibroblastos de riñón de hámster, y Cos-7, derivada de fibroblastos de riñón de mono, se cultivaron en “medio de crecimiento”: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) suplementado con suero fetal bovino 10% (SFB) (Internegocios S.A., Mercedes, Argentina), estreptomicina 100 μ g/ml, penicilina 100 U/ml y de anfotericina B 250 ng/ml (antibiótico-antimicótico, Gibco). Se dividieron periódicamente cada 2-4 días, utilizando 0.8% tripsina-EDTA (Gibco).

La línea celular 3617, derivada de adenocarcinoma mamario murino (PMID 10579933), fue generada en el laboratorio del Dr. Gordon Hager (NIH, Estados Unidos) y contiene un arreglo en tándem (~200 copias) de una repetición terminal larga del virus de tumor mamario murino (MMTV), integrado en el cromosoma 4 [334]. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con SFB 10% (Life Technologies, Grand Island, NY, Estados Unidos) y L-glutamina 2 mM (Life Technologies). Se crecieron en presencia de tetraciclina 5 μ g/ml (Sigma-Aldrich) para prevenir la expresión de GFP-GR, integrado de manera estable [169]. Los experimentos que involucran a esta línea celular fueron realizados por el Dr. Diego Presman, colaborador de nuestro grupo en el laboratorio del Dr. Hager. El análisis de los datos obtenidos y su interpretación forman parte del presente trabajo de Tesis.

Todas las células se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo CO₂ 4.5%.

5.3. Preparación de muestras celulares

Para los ensayos de microscopía que incluyen células BHK en cultivo, se utilizaron cubreobjetos circulares de 25 mm de diámetro (Menzel-Gläser, Brunswick, Alemania). Inmediatamente antes de analizar las muestras en el microscopio, los cubreobjetos se montaron sobre un adaptador de aluminio especialmente diseñado para microscopía y se les agregó 1 ml del medio correspondiente.

Para los ensayos de microscopía realizados con muestras de células BHK fijadas, se utilizaron cubreobjetos cuadrados de 20 mm de lado.

En ambos tipos de ensayos, los cubreobjetos se esterilizaron previamente mediante incubación en etanol durante 5 min y posterior irradiación con luz UV durante 20 min. Los cubreobjetos se dispusieron en placas de 6 pocillos (p6). Luego se sembraron 3×10^5 células BHK por pocillo en medio de crecimiento.

Para los ensayos de microscopía realizados en células 3617, se sembraron 10^5 células por pocillo en placas Lab-Tek (Thermo Fisher), que poseen un cubreobjetos incorporado a la placa para su directa visualización en el microscopio. Se cultivaron desde la siembra en DMEM suplementado con SFB delipidado (libre de esteroides) 10% (Life Technologies), L-glutamina 2 mM y tetraciclina 5 µg/ml. Para los experimentos en que se requirió la expresión de GFP-GR, las células se sembraron sin tetraciclina en el medio de cultivo.

Para los ensayos de gen reportero, se sembraron 10^5 células Cos-7 ó 6×10^4 células BHK por pocillo, en medio de crecimiento sobre placas de 24 pocillos (p24).

Como se verá en la sección siguiente, en todos los ensayos las células se transfectaron 16-24 h después de ser sembradas.

5.4. Transfecciones transitorias

5.4.1. Plásmidos

En el presente trabajo de Tesis se utilizaron los siguientes plásmidos:

pEGFP-C3: vector de expresión de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*). Permite clonado de una proteína quimera con EGFP en el extremo N-terminal. Posee resistencia bacteriana a kanamicina (Clontech).

pmCherry-C1: vector de expresión de la proteína fluorescente mCherry. Permite clonado de una proteína quimera con mCherry en el extremo N-terminal. Posee resistencia bacteriana a ampicilina (TOP Gene Technologies).

pEGFP-GR: vector de expresión de EGFP fusionado al extremo N-terminal del GR de ratón. Posee resistencia bacteriana a kanamicina. Cedido gentilmente por Mario Galigniana [364].

pEGFP-GRdim: vector de expresión de EGFP fusionado al extremo N-terminal del mutante GR^{A465T} de ratón, generado por mutagénesis sitio-dirigida (TOP Gene Technologies, Quebec, Canada). Posee resistencia bacteriana a kanamicina [169].

pEGFP-GRmon: vector de expresión de EGFP fusionado al extremo N-terminal del doble mutante GR^{A465T/I634A} de ratón, generado por mutagénesis sitio-dirigida (Stony Brook University, Nueva York, Estados Unidos). Posee resistencia bacteriana a kanamicina [169].

pmCherry-GR: vector de expresión de mCherry fusionado al extremo N-terminal del GR de rata. Posee resistencia bacteriana a kanamicina. Cedido gentilmente por Gordon Hager [169].

pEGFP-NCoA-2: vector de expresión de EGFP fusionado a NCoA-2. Posee resistencia bacteriana a kanamicina. Cedido gentilmente por Mónica Costas [365].

pmCherry-NCoA-2: vector de expresión de mCherry fusionado a NCoA-2. Posee resistencia bacteriana a kanamicina. Cedido gentilmente por Gordon Hager [366].

pEGFP-PML: vector de expresión de EGFP fusionado a PML-I humana. Posee resistencia bacteriana a kanamicina. Cedido gentilmente por Peter Hemmerich [74].

pH2B-mCherry: vector de expresión de mCherry fusionado al extremo C-terminal de la histona 2B humana. Posee resistencia bacteriana a ampicilina. Cedido gentilmente por Robert Benezra [367].

pMMTV-Luc: vector reportero con el gen de luciferasa bajo el control del promotor del virus de tumor mamario murino (MMTV), que contiene cinco GRE [368].

pCMV-LacZ: vector con el gen de la enzima β -galactosidasa bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV).

pCMV: vector con promotor CMV vacío.

5.4.2. Preparación de plásmidos a gran escala

5.4.2.1. Preparación de bacterias competentes

Bacterias de la especie *Escherichia coli*, cepa DH5 α se cultivaron en medio LB (peptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 5 g/l) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.3. A 5 ml de ese cultivo se le agregaron 100 ml de LB y se creció hasta una OD de 0.5. Posteriormente se mantuvo el cultivo durante 10 min a 0°C y se centrifugó por 10 min a 3000xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 40 ml de TFB I (acetato de potasio 30 mM; KCl 100 mM; CaCl₂ 10 mM; MnCl₂ 50 mM; glicerol 15%v/v; pH 5.2). Se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó nuevamente por 10 min a 3000xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 4 ml de TFB II (MOPS 10 mM; CaCl₂ 75 mM; KCl 10 mM; glicerol 15%v/v; pH 6.5). A continuación se incubaron las células en hielo durante 15 min para luego guardarlas a -80°C en alícuotas de 200 μ l. Las bacterias competentes se utilizaron a partir de las 48 h de haber realizado este procedimiento.

5.4.2.2. Transformación de bacterias competentes

Se incubaron 50 μ l de las bacterias competentes con 1 μ g de ADN plasmídico durante 30 min en hielo. A continuación se indujo la transformación mediante *shock* térmico a 42 °C durante 90 s. Luego se incubó en medio LB líquido, sin antibiótico, a 37°C durante 30 minutos en agitación permanente. Las bacterias se plaquearon en placas de Petri conteniendo LB-ágar (LB + ágar 15 g/l) con ampicilina 100 μ g/ml o kanamicina 50 μ g/ml, según correspondiese, y se dejaron en estufa a 37°C. Al día siguiente se picaron algunas colonias y se realizaron minicultivos de 3 ml en LB con ampicilina o kanamicina a 37°C, en agitación permanente, durante 24 h.

5.4.2.3. Preparación de plásmidos

A partir del minicultivo se preparó un maxicultivo de 24-36 h a 37°C en 400 ml de medio *Terrific Broth* (peptona 13.3 g/l; extracto de levadura 26.75 g/l; glicerol 0.45%v/v; KH_2PO_4 2.6 g/l; K_2HPO_4 13.9 g/l) con ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 50 µg/ml, según correspondiese. Se centrifugaron las bacterias 15 min a 5500xg y se descartó el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 10 ml de Solución I (Tris- HCl 25 mM pH 8; EDTA 10 mM pH 8), se agitaron durante 5 min y se les agregó 20 ml de Solución II (NaOH 0.2 M; SDS 1%v/v). Luego se mezcló por inversión y se dejó en hielo por 20 min. Posteriormente se colocaron 15 ml de Solución III (acetato de potasio 3 M; ácido acético glacial 11.5%v/v), se mezcló por inversión, se dejó 5 min en hielo y se centrifugó por 30 min a 15000xg a 4°C. Al sobrenadante se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló, y se dejó 20 min a -20°C. Se centrifugó 15 min a 12000xg a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 3 ml de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM), se agregó igual volumen de LiCl 5 M (a -20°C), se mezcló y se centrifugó a 12000xg por 5 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante, se le agregó igual volumen de isopropanol, se mezcló y se centrifugó 5 min a 12000xg a 4°C. El sobrenadante se descartó, el *pellet* se resuspendió en 0.5 ml de TE y se agregó 1 µl de ribonucleasa A 20 mg/ml. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó igual volumen de 13% m/v polietilenglicol en NaCl 1.6 M, se mezcló y se centrifugó 5 min a 12000xg. El *pellet* obtenido se resuspendió en 0.4 ml de TE. Se realizaron extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol saturado en TE (una vez), 1 volumen de fenol:cloroformo 1:1 (dos veces), y 1 volumen de cloroformo (una vez). Se agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol. Se dejó 20 min a -20°C. Por último, se centrifugó 15 min a 12000xg, se lavó con 70% etanol y se resuspendió el pellet en 300 µl de TE. Se determinó la concentración de ADN con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se obtuvieron preparaciones de ADN plasmídico con concentraciones de 5-20 mg/ml y cociente de absorbancias a 260 y 280 nm entre 1.8 y 2.

5.4.3. Transfección por lipofección

Se utilizó el método de lipofección para transfectar de forma transitoria las células BHK y Cos-7. Las células se cultivaron según se indica en la sección 5.3. 16-24 h después de sembrar las células, se prepararon en tubos diferentes la mezcla de plásmidos en DMEM y la mezcla de Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific) con DMEM, según se indica en la Tabla 5.1.

La mezcla de plásmidos se agregó gota a gota al tubo conteniendo el agente de transfección, y se incubó 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección. El medio de crecimiento de las células se reemplazó por DMEM. Se adicionaron gota a gota los complejos de transfección sobre las células y se incubó durante 6 h. Luego de este período, el medio se reemplazó por DMEM.

Línea celular	Placa	# Células sembradas	Volumen de transfección (μl)*	Relación Lipofectamine (μl): ADN (μg)	ADN (μg)
BHK	p6	3x10 ⁵	50 en 700	1:1	1.50 mCh-NCoA-2 / GFP-NCoA-2 1.00 GFP-GR / GFP-GRdim / GFP-GRmon / mCh-GR 0.50 mCherry / GFP-PML 0.25 GFP 0.15 H2B-mCh
BHK	p24	6x10 ⁴	15 en 180	1:2	0.30 LacZ + 0.25 MMTV-Luc + 0.25 GFP / GFP-GR + 0.37 mCh-NCoA-2 / GFP:CMV vacío (1:1)
Cos-7	p24	10 ⁵	15 en 180	1:2	0.30 LacZ + 0.25 MMTV-Luc + 0.25 GFP-GR / GFP-GRdim / GFP-GRmon + 0.30 mCh-NCoA-2 / GFP:CMV vacío (1:1)

Tabla 5.1. Transfecciones transitorias por lipofección. Se muestran las condiciones utilizadas durante la transfección, según la línea celular y el tamaño de placa utilizado.

*Un volumen de transfección de, por ejemplo, “50 en 700” implica que la mezcla de plásmidos y la mezcla de Lipofectamine se realizan en 25 μl de DMEM cada una, y los complejos resultantes se agregan a 700 μl de DMEM en la placa.

Las células 3617 se transfectaron de forma transitoria mediante un método no liposomal utilizando el *kit* jetPRIME (PolyPlus, New York, NY, Estados Unidos) como agente de transfección. Brevemente, se mezclaron 1-2 μ g de ADN con 3-6 μ l del reactivo *JetPrime*, en 200 μ l de la solución provista por el *kit*. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se agregó la mezcla gota a gota a las células, con 1 ml de DMEM conteniendo SFB delipidado 10%. Luego de 4 h se reemplazó el medio para eliminar el exceso de reactivo.

Para los ensayos de N&B en los que se cotransfectaron pEGFP-GR y pmCherry-GR, se agregaron cantidades relativas variables de cada plásmido (de 1:6 a 6:1) con el fin de obtener un espectro amplio de expresión relativa de ambas proteínas. La cantidad total de plásmidos fue de 2 μ g por pocillo.

5.5. Tratamientos hormonales

El ligando 21-OH se utilizó en concentración 10 μ M. Dex se utilizó en concentración 10 nM en células BHK y Cos-7, y 100 nM en células 3617. Las muestras control se prepararon agregando etanol 0.1%v/v.

En los ensayos de microscopía, las células BHK se incubaron 16-22 h luego de la transfección en DMEM y se realizaron los tratamientos hormonales. Las células se incubaron 30 min en presencia de hormonas antes de la adquisición de datos.

En los ensayos de gen reportero, las hormonas se agregaron inmediatamente luego de la transfección, totalizando un tratamiento hormonal de 16-22 h en DMEM.

En ensayos de microscopía, las células 3617 se incubaron 16-22 h en DMEM suplementado con SFB delipidado 10% y de L-glutamina 2 mM. Luego se incubaron en presencia de las hormonas 30 min antes de la adquisición de datos.

5.6. Digestión con nucleasas *in situ*

Las células BHK se prepararon como se indica en las secciones 5.3., 5.4. y 5.5. Luego del tratamiento hormonal, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (PFA) (Biopack, Argentina) en PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4)

durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizaron con solución de permeabilización (NaCl 10 mM; sacarosa 300 mM; Pipes 10 mM pH 6.8; MgCl₂ 3 mM, Tritón X-100 0.5%v/v) durante 10 min a 4°C. Se incubaron con solución de extracción ((NH₄)₂SO₄ 250 mM; sacarosa 300 mM; Pipes 10 mM pH 6.8; MgCl₂ 3 mM, Tritón X-100 0.5%v/v) durante 5 min a 4°C. A continuación se digirieron con solución de digestión (NaCl 10 mM; sacarosa 300 mM; Pipes 10 mM pH 6.8; MgCl₂ 3 mM, Tritón X-100 0.5%v/v; desoxirribonucleasa I 100 µg/ml o ribonucleasa A 100 µg/ml) durante 60 min a 37°C. Finalmente, las células se incubaron con solución de extracción durante 5 min a 4°C y se fijaron con PFA 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con solución de montaje (glicerol 80%v/v en PBS) y se mantuvieron en oscuridad hasta ser observados en el microscopio.

5.7. Ensayos de gen reportero

Las células BHK y Cos-7, preparadas como se indica en las secciones 5.3, 5.4 y 5.5, se lavaron con PBS y se lisaron con 115 µl de solución de lisis (Cell Culture Lysis Reagent, Promega). Se transfirieron los lisados a tubos *Eppendorf* y se centrifugaron 5 min a máxima velocidad en microcentrifuga a 4°C. Las determinaciones de actividad enzimática se realizaron sobre los sobrenadantes (extractos).

Se utilizó un método colorimétrico para cuantificar la actividad β-galactosidasa [369]. Se mezclaron 35 µl de extracto con 375 µl de solución Z (Na₂HPO₄ 60 mM; NaH₂PO₄ 40 mM; KCl 10 mM; MgSO₄ 1 mM; β-mercaptoetanol 0.27%) y 75 µl de orto-nitro-fenil-galactopiranósido 4 mg/ml (Sigma). La mezcla de reacción se incubó a 37°C hasta observar la aparición de color amarillo (aproximadamente 1-2 h de incubación). Se detuvo la reacción simultáneamente en todas las muestras con 188 µl de Na₂CO₃ 1 M y se determinó por duplicado la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro Model 680 Microplate Reader (Bio Rad). Se utilizó como blanco una mezcla de reacción sin extracto. Para cuantificar la actividad de luciferasa, se usó el *kit* Luciferase Assay System (Promega). Se incubaron 45 µl del extracto con 20 µl de luciferina en la solución correspondiente provista por el fabricante (Luciferase Assay System, Promega) en oscuridad y se cuantificó la luminiscencia dentro del primer minuto de reacción, con un tiempo de integración de 10 s en un luminómetro GloMax Microplate Reader (Promega). Se utilizó como blanco la luciferina en la solución, sin extracto. La actividad de gen reportero en

cada muestra se expresó como la actividad de luciferasa normalizada por la actividad de β -galactosidasa. En cada caso se restó la actividad del blanco.

5.8. Obtención de imágenes por microscopía confocal

Las imágenes de células BHK se obtuvieron en un microscopio confocal FV1000 (Olympus), con un objetivo de aceite de inmersión UplanSApo 60X (Olympus), de apertura numérica 1.35. Los fluoróforos GFP y mCherry se excitaron con un láser de Argón multi-líneas sintonizado a 488 nm y un láser de Helio-Neón de 543 nm, respectivamente. La potencia promedio de los láseres sobre las muestras fue de ~700 nW. La apertura confocal se mantuvo en 105 μ m. La emisión de fluorescencia proveniente de los dos fluoróforos se separó por un espejo dicróico SDM560, y se utilizaron bandas de detección espectrales en 500-530 nm y 600-700 nm para GFP y mCherry, respectivamente. La fluorescencia se detectó con fotomultiplicadores configurados en modo *pseudo photon-counting*. La adquisición de las imágenes se realizó en modo secuencial de línea.

El tamaño de píxel se ajustó en 82 nm. Se obtuvieron imágenes con un tamaño de 256x256 píxeles, con un tiempo de barrido de 40 μ s/píxel.

Las imágenes de las células 3617 fueron obtenidas por el Dr. Diego Presman en el *Center for Cancer Research* (CCR), en las instalaciones del LRBGE, *Optical Imaging Core* (NIH, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), en un microscopio LSM 780 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, Estados Unidos), equipado con una cámara termostatzada y un objetivo de aceite de inmersión 40X y apertura numérica 1.4. GFP se excitó con un láser de Argón multi-líneas sintonizado a 488 nm. La fluorescencia se detectó con un fotomultiplicador GaAsP en modo de integración, usando un filtro de emisión de 490-561 nm. Se tomaron seis planos z separados entre sí por 1.1 μ m sobre campos elegidos aleatoriamente, con un tamaño de píxel de 100 nm. En caso de no observarse el arreglo MMTV en la imagen, se realizó manualmente un barrido en z para corroborar este resultado.

5.9. Análisis de *foci* intranucleares

Para detectar de forma automatizada los *foci* intranucleares en imágenes de microscopía confocal, se utilizó el programa *ilastik* (www.ilastik.org) [370], en el modo *density counting*. Este programa permite contar objetos brillantes (como los *foci*) sobre un fondo ruidoso (como el nucleoplasma).

El usuario debe señalar 5-10 *foci* y el fondo en las algunas imágenes representativas, y el programa utiliza estas observaciones para identificar *foci* de forma automática en el resto de las imágenes analizadas. La salida de este programa consistió en una imagen representando la probabilidad de encontrar un *focus* en cada píxel de la imagen original. Esta imagen de salida se binarizó y procesó utilizando la herramienta “*Analyze particles*” del programa *ImageJ* (NIH, Estados Unidos), para contar *foci* (requisito de tamaño de 9-100 píxeles²) y determinar la intensidad de fluorescencia de los *foci* medida en la imagen original. Se utilizó la imagen original para descartar aquellos agregados brillantes que no se encontraban en el núcleo.

Se determinó el área nuclear de cada célula con *ImageJ* y se calculó a partir de estas determinaciones la densidad areal de *foci* intranucleares.

5.10. Determinación cuantitativa de la colocalización de *foci*

Para determinar de manera cuantitativa el grado de colocalización de *foci* detectados en dos canales de fluorescencia (por ejemplo, GFP-GR y mCherry-NCoA-2), se utilizó un método basado en objetos [371]. Se asumió que dos *foci* detectados en distintos canales colocalizan si sus centroides se encuentran separados entre sí por una distancia menor a la resolución óptica del microscopio (0.2 μm).

Se obtuvo con *ImageJ* el centroide de cada *focus* como su posición puntual promedio, ponderada por las posiciones de todos los píxeles que lo componen. Luego, se diseñó una rutina de MATLAB (MathWorks) para hallar, en cada centroide del canal con menor densidad de *foci*, el centroide vecino más cercano (VMC) del otro canal. De esta manera se calcularon las distancias de cada centroide con su VMC y se determinó el grado de colocalización como el porcentaje de *foci* separados por una distancia menor a 0.2 μm de su VMC. Este porcentaje se relativizó respecto al valor determinado para el canal que mostró menor densidad de *foci*.

Como control, se diseñó una rutina de MATLAB para determinar el grado de colocación de centroides ubicados al azar en dos canales distintos. Se utilizaron áreas y densidades similares a las experimentales y se analizaron los datos de la misma manera.

5.11. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

5.11.1. Obtención de datos experimentales

Las medidas de FCS de punto único y de barrido orbital se realizaron sobre células BHK en cultivo, transfectadas y tratadas como se explicó en las secciones 5.3, 5.4 y 5.5. Para observar las células, el cubreobjetos se montó en una cámara especialmente diseñada para microscopía y se agregó 1ml del medio correspondiente, según el tratamiento. Las células se mantuvieron incubadas en estufa a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ 4.5% hasta el momento de las mediciones. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Cada preparado se observó por un máximo de una hora en el microscopio y luego se descartó.

Las medidas de FCS de punto único (*single-point FCS*) se realizaron en un microscopio confocal FV1000 (Olympus), con un objetivo de inmersión en aceite UplanSApo 60x (Olympus), de apertura numérica 1.35. Los fluoróforos GFP y mCherry se excitaron con un láser multi-líneas de Argón sintonizado a 488 nm y un láser de Helio-Neón de 543 nm, respectivamente. La potencia promedio de excitación de los láseres sobre las muestras fue de ~700 nW. La apertura confocal se mantuvo en 105 µm. La fluorescencia proveniente de los dos fluoróforos se separó en dos canales por un espejo dicróico SDM560, y se utilizaron bandas de detección espectrales en 500-530 nm y 600-700 nm para GFP y mCherry, respectivamente. La fluorescencia se detectó con fotomultiplicadores configurados en modo *pseudo photon-counting*. Se eligieron células con expresión baja o media. Las medidas se hicieron en posiciones al azar dentro del núcleo aunque se evitaron los nucleolos y los *foci*. El tiempo de muestreo fue de 20 µs (frecuencia de 50000 Hz) y la duración de cada medida fue ~3 min (aproximadamente 8x10⁶ datos por medida). Los experimentos involucraron la adquisición de 25-45 datos, dependiendo el caso, y realizándose siempre una única medición por célula para minimizar el daño celular.

Las medidas de FCS de barrido orbital (*orbital scanning-FCS*) se realizaron en un microscopio de excitación por dos fotones construido sobre el cuerpo de un microscopio IX70 (Olympus) [372], ubicado en el *Laboratory for Fluorescence Dynamics* (Universidad de

California, Irvine, Estados Unidos), bajo la dirección del Dr. Enrico Gratton, Se utilizó un objetivo de inmersión en agua UplanSApo 60x (Olympus), de apertura numérica 1.2. Ambos fluoróforos, GFP y mCherry, se excitaron con un láser de Titanio-Zafiro Chamaleon Ultra (Coherent) sintonizado a 810 nm. El microscopio se controló por el programa SimFCS (LFD, Universidad de California, Irvine). El barrido del láser se realizó con dos espejos controlados por una tarjeta I/O Tec (Measurement Computing). La fluorescencia emitida por los fluoróforos se separó en dos canales por un espejo dichroico LP 550, y se utilizaron filtros de emisión BP 505-535 nm y BP 602-678 nm para GFP y mCherry, respectivamente. La fluorescencia se detectó con fotomultiplicadores en modo *photon-counting*. En cada medida, el láser barrió órbitas de radio 2.6 μm (256 píxeles; tamaño de píxel = 83 nm) repetidamente intersectando *foci* intranucleares. El número de órbitas trazadas fue de 6×10^5 . El tiempo de muestreo de píxel fue de 20 μs y el de la órbita fue de 5.1 ms (frecuencia de 195 Hz).

Las medidas de FCS de barrido lineal en células 3617 fueron adquiridas por el Dr. Diego Presman en un microscopio LSM 780 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, Estados Unidos), ubicado en el *Center for Cancer Research* (CRC), en las instalaciones de *LRBGE Optical Imaging Core* (NIH, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 63X y apertura numérica 1.4. GFP y mCherry se excitaron con un láser de Argón sintonizado a 488 nm y un láser de 594 nm, respectivamente. La fluorescencia se detectó con un fotomultiplicador GaAsP en modo contador de fotones, usando filtros de emisión de 490-561 nm y 606-695 nm para GFP y mCherry, respectivamente. En cada medida, el láser barrió repetidamente líneas de 3.4 μm (48 píxeles; tamaño del píxel = 70 nm) que intersectaban el arreglo MMTV. El número total de líneas trazadas fue de 2×10^5 . El tiempo de muestreo de píxel fue de 6.82 μs y el de la línea, 0.764 ms (frecuencia de 1309 Hz).

5.11.2. Obtención de datos de simulaciones

Las simulaciones de medidas de FCS se realizaron mediante el uso combinado de tres plataformas computacionales: Blender, MCell y FERNET (*Fluorescence Emission Recipes and Numerical routines Toolkit*) (Figura 5.1). El programa Blender (<http://www.blender.org>) permite generar escenarios 3D complejos para modelar ambientes realísticos, similares a los que se pueden encontrar en una célula. Blender se combinó con MCell mediante el *plugin* CellBlender. MCell (<http://mcell.org>) es un paquete de rutinas que permite simular moléculas involucradas en difusión y reacciones químicas, a partir de probabilidades de Monte Carlo. FERNET constituye

otro paquete de rutinas que permite simular la adquisición de datos de diversas técnicas de microscopía de fluorescencia a partir de las trayectorias moleculares obtenidas por MCell (Figura 5.1) [373].

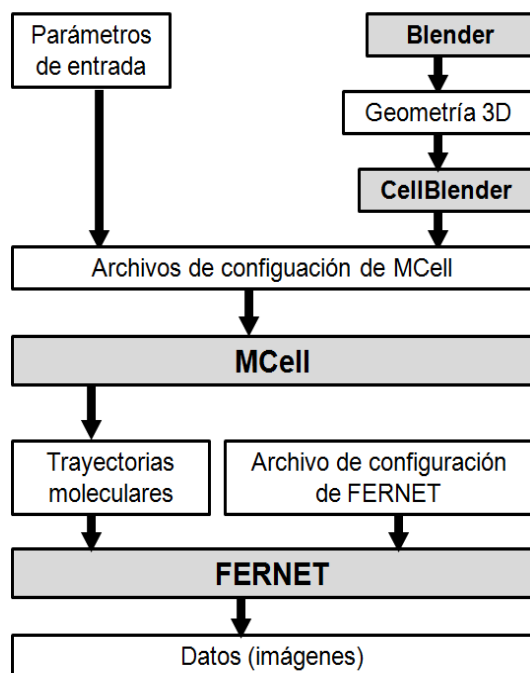


Figura 5.1. Esquema del flujo de trabajo en la plataforma MCell-FERNET. Modificado de [373].

En la plataforma MCell-Blender se configuró un espacio cúbico de $3\ \mu\text{m}$ de lado con dos tipos de moléculas *A* y *B* que difundían libremente con un coeficiente de difusión $D = 30\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ y podían formar un complejo *AB* con $k_{on} = 10^9\ \text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $k_{off} = 40\ \text{s}^{-1}$. Al complejo *AB* libre se le asignó un $D = 10\ \mu\text{m}^2/\text{s}$. A su vez, se dispusieron sitios fijos *F* ($D = 0$), a los cuales se podían unir *A*, *B* o *AB*, según el escenario planteado, con $k_{on} = 10^9\ \text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $k_{off} = 15\ \text{s}^{-1}$. Se simularon un total de alrededor de 160 moléculas *A* (10 nM), alrededor de 160 moléculas *B* (10 nM) y alrededor de 3000 sitios *F* (190 nM). Se seleccionó un tiempo de muestreo de $10\ \mu\text{s}$ y se realizaron 10^6 iteraciones por simulación. Para cada escenario, primero se realizaron simulaciones de prueba para obtener las concentraciones en el equilibrio de todas las especies, de manera de inicializar luego desde estas concentraciones iniciales. Los parámetros de entrada para cada escenario simulado (descritos en detalle en la sección 6.7) se resumen en la siguiente Tabla:

	Complejo total (I)	Liberación aleatoria (II)	Liberación secuencial (III)	Unión secuencial (IV)	Secuencial total (V)
$[A]_{\text{libre}}$	9.2	9.2	8.6	0.62	0.62
$[B]_{\text{libre}}$	9.2	9.2	9.6	9.2	8.3
$[AB]_{\text{libre}}$	0.92	0.86	0.62	0.8	0.12
$[Foci (F)]_{\text{libre}}$	185	169	175	166	162
$[AF]$	0	0.25	0.98	8.6	8.9
$[BF]$	0	0.25	0	0	1.2
$[ABF]$	3.7	0.31	0.92	0.92	1.2
$A+B \leftrightarrow AB$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 50$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 40$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 40$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 40$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 40$
$A+F \leftrightarrow AF$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 0$
$B+F \leftrightarrow BF$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$
$A+BF \leftrightarrow ABF$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$
$B+AF \leftrightarrow ABF$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 0$
$AB+F \leftrightarrow ABF$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 5$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 15$	$k_{\text{on}}: 10^9$ $k_{\text{off}}: 0$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 15$	$k_{\text{on}}: 0$ $k_{\text{off}}: 0$

Tabla 5.2. Parámetros de entrada de simulaciones en MCell-FERNET. Se muestran las concentraciones (en unidades nM) de cada especie en el equilibrio y la k_{on} (en unidades $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) y la k_{off} (en unidades de s^{-1}) de las reacciones de asociación, configuradas como parámetros de entrada para las simulaciones de los distintos escenarios. Las simulaciones se realizaron en espacios cúbicos de $3 \mu\text{m}$ de lado, con un tiempo de muestreo de $10 \mu\text{s}$. Se asignó un coeficiente de difusión de $30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para las especies A y B , $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para el complejo AB y nulo para los *foci* o las moléculas unidas a los *foci*.

En la plataforma FERNET se asignaron brillos moleculares de 100000 cps tanto para *A* como para *B* indicando además que la fluorescencia de cada uno de los dos tipos moleculares se detecta únicamente en uno de los dos canales de detección (esto es, no hay sangrado entre canales). Se configuró una PSF gaussiana con $\omega_0=0.2 \mu\text{m}$ y $\omega_z=1 \mu\text{m}$. La adquisición de datos de FCS de punto único se hizo en modo “multi”, es decir, midiendo simultáneamente en 25 posiciones a la vez, separadas entre sí por $0.4 \mu\text{m}$ en las direcciones *x* e *y*. De esta manera se obtuvieron 25 trazas temporales de intensidad de fluorescencia en dos canales para cada simulación. Para cada escenario, se realizaron tres simulaciones a partir de distintas semillas.

5.11.3. Análisis de datos

Los datos de FCS de punto único, ya sean experimentales o simulados, consisten en trazas temporales de intensidad de fluorescencia en cada canal. Estos datos se analizaron con el programa SimFCS. Allí se calcularon las funciones de autocorrelación (ACF) para ambos canales:

Ecuación 5.1

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

En donde $I(t)$ es la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, τ el tiempo de retardo y $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$. En los experimentos de espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS) también se calculó la función de correlación cruzada (CCF) entre los dos canales verde y rojo a partir de las dos trazas de intensidad $I_v(t)$ e $I_r(t)$:

Ecuación 5.2

$$G_{cc}(\tau) = \frac{\langle \delta I_v(t) \cdot \delta I_r(t+\tau) \rangle}{\langle I_v(t) \rangle \cdot \langle I_r(t) \rangle}$$

Para realizar estos cálculos, en el caso de las medidas experimentales, cada traza se dividió en segmentos de $\sim 5 \times 10^5$ datos (equivalentes a 5.25 s de duración), se calcularon la funciones de correlación segmento a segmento y se obtuvieron curvas promedio para cada medida a partir de todos los segmentos. La longitud de segmento fue suficiente para observar la relajación de la curvas de ACF y CCF a cero, y al mismo tiempo obtener una estadística adecuada, con el menor ruido posible.

En los datos de FCS de barrido orbital y lineal, fue necesario hacer un procesamiento previo para obtener la traza temporal de fluorescencia proveniente de la región de interés (el *focus* o el arreglo MMTV). La Dra. Luciana Bruno (Instituto de Física de Buenos Aires, UBA-CONICET) diseñó una rutina de seguimiento de partícula única en MATLAB (MathWorks) para hallar la posición central del *focus* o el arreglo MMTV a lo largo del tiempo. La rutina ajusta una función gaussiana a la intensidad de fluorescencia del *focus* o el arreglo MMTV y de esta manera obtiene la posición del centro con precisión subpíxel [374, 375]. Una vez obtenida la trayectoria del *focus* o el arreglo MMTV en la matriz de intensidad-tiempo-posición (*kmyograph*), se construyó la traza temporal de intensidad de fluorescencia del *focus* o el arreglo MMTV como la suma de intensidades de los píxeles que forman parte del mismo. En los casos en que se midió fluorescencia en dos canales, la señal del canal correspondiente a GFP se utilizó para hallar la trayectoria del *focus* o el arreglo MMTV, y luego coleccionar la traza de intensidad de fluorescencia de la misma región en el canal correspondiente a mCherry. Las ACF y la CCF de los *foci* o el arreglo MMTV se calcularon con el programa SimFCS a partir de las trazas temporales obtenidas.

5.11.4. Cálculo de constante de asociación

En los experimentos de FCCS, se calculó una constante de asociación aparente (K_a) entre GFP-GR y mCherry-NCoA-2 en el núcleo de células BHK vivas en diferentes condiciones. K_a se define como la constante de equilibrio del proceso de formación del complejo GR:NCoA-2, asumiendo una estequiometría 1:1:



Ecuación 5.4
$$K_a = \frac{[GR:NCoA2]}{[GR][NCoA2]}$$

El cálculo de la K_a requiere entonces determinar las concentraciones del complejo y de GR y NCoA-2 libres en el núcleo de las células. Para calcular las concentraciones en el equilibrio de estas tres especies, se utilizaron las amplitudes de las ACF y CCF calculadas a partir de los datos de FCS de punto único [288]:

$$\text{Ecuación 5.5} \quad [GR] = \frac{\gamma}{G_{GR} \cdot N_A \cdot V_{PSF}} - [GR: NCoA2]$$

$$\text{Ecuación 5.6} \quad [NCoA2] = \frac{\gamma}{G_{NCoA2} \cdot N_A \cdot V_{PSF}} - [GR: NCoA2]$$

$$\text{Ecuación 5.7} \quad [GR: NCoA2] = \frac{\gamma \cdot G_{CC}}{N_A \cdot V_{PSF} \cdot G_{GR} \cdot G_{NCoA2}}$$

En donde $\gamma = 0.35$ es un factor geométrico que depende del perfil de detección óptico [376], $V_{PSF} = \omega_0^2 \cdot \omega_z \cdot (\pi/2)^{3/2}$ es el volumen de la función de dispersión de punto (PSF, *point spread function*), N_A es el número de Avogadro, y G_{GR} , G_{NCoA2} y G_{CC} son las amplitudes de la ACF del canal del GR, la ACF del canal de NCoA-2 y la CCF, respectivamente. $\omega_0 = 0.25 \mu\text{m}$ y $\omega_z = 1 \mu\text{m}$ representan la dimensión lateral y la dimensión axial de la PSF, respectivamente.

Las amplitudes de las ACF o CCF se calcularon a partir del valor promedio de los primeros 5 datos de cada curva para disminuir el ruido. Se calculó un valor de K_a para cada medida de FCS de punto único, y luego se realizó un promedio de K_a para medidas correspondientes a una misma condición.

5.11.5. Ajuste de datos

Las ACF calculadas a partir de los datos de FCS de punto único se analizaron por una versión extendida del modelo de reacción dominante [290], que explica la función de correlación $G(\tau)$ incluyendo una población de moléculas en difusión libre y moléculas involucradas en la unión a dos poblaciones distintas de sitios fijos [377]:

$$\text{Ecuación 5.8} \quad G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[f_D \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} + f_R e^{-\tau/\tau_R} + f_L e^{-\tau/\tau_L} \right]$$

En donde N es el número promedio de moléculas móviles en el volumen de observación; D es el coeficiente de difusión; f_D es la fracción poblacional de moléculas involucradas en difusión libre; f_R y f_L son las fracciones poblacionales involucradas en interacciones rápidas y lentas con sitios fijos; τ_R y τ_L son sus respectivos tiempos de residencia en esos sitios. Las recíprocas de los tiempos de residencia corresponden a las constantes de disociación k_{off} de estos sitios.

Este modelo no considera la variabilidad intranuclear de afinidades que pueden existir en las poblaciones que interaccionan con los sitios rápidos y lentos [328], sino que provee valores promedio para estos parámetros. Por otra parte, el modelo asume que las concentraciones de sitios fijos son independientes entre sí, constantes y muy altas en relación a las concentraciones de sitios ocupados [290].

La ecuación 5.8 se ajustó a los datos de ACF usando una rutina diseñada en MATLAB. Esta rutina ajustó de manera global los datos provenientes de distintas medidas y una misma condición. Se asumieron entonces tiempos de residencia comunes (rápido y lento) para las distintas medidas de una misma condición, mientras que el resto de los parámetros (las dos fracciones poblacionales unidas, la fracción difusional y el tiempo característico difusional) se ajustaron individualmente para cada medida.

Debido a que las medidas de FCS de barrido presentaron una mayor variabilidad intercelular, no se pudo realizar un ajuste global con esta rutina. Por el contrario, se ajustó a cada ACF individualmente utilizando la función *Fit* del programa SimFCS. Además, dado que el tiempo de muestreo en este tipo de experimentos fue más lento que en los de FCS de punto único (0.764 ms en barrido lineal; 20 μ s en punto único), no fue posible observar el decaimiento de la correlación característico de la difusión libre. Por ello, se ajustó a los datos de ACF provenientes de medidas de FCS de barrido lineal sobre el arreglo MMTV un modelo que considera únicamente interacciones con sitios fijos lentos y rápidos:

Ecuación 5.9
$$G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} [p_R e^{-\tau/\tau_R} + p_L e^{-\tau/\tau_L}]$$

En donde p_R y p_L son las fracciones poblacionales unidas a los sitios rápidos y lentos.

Los datos provenientes de FCS de barrido orbital sobre *foci* se adquirieron con una resolución temporal aun menor (5.1 ms) que en barrido lineal. Por lo tanto, a estos datos se pudo ajustar un modelo más simple, incluyendo únicamente un componente (p_B) de unión a sitios fijos con un tiempo de residencia característico (τ_B):

Ecuación 5.10
$$G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} [p_B \cdot e^{-\tau/\tau_B}]$$

Los datos de FCS obtenidos a partir de simulaciones fueron ajustados por el modelo de reacción dominante presentado por Michelman-Ribeiro y col. [290]. Este modelo incluye un componente (f_D) de difusión libre y otro (f_B) de unión a sitios fijos, con un tiempo de residencia característico (τ_B):

$$\text{Ecuación 5.11} \quad G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[f_D \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} + f_B e^{-\tau/\tau_B} \right]$$

Este modelo se utilizó también para ajustar los datos de FCS de GFP en el núcleo. Por otra parte, se examinaron otros modelos de ajuste a estos mismos datos, uno de difusión libre (Ecuación 5.12) y otro de difusión anómala (Ecuación 5.13):

$$\text{Ecuación 5.12} \quad G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[\left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4\tau D}{\omega_z^2} \right)^{-1/2} \right]$$

$$\text{Ecuación 5.13} \quad G(\tau) = \frac{1}{2^{3/2}N} \left[\left(1 + \left(\frac{4\tau D}{\omega_0^2} \right)^\alpha \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{4\tau D}{\omega_z^2} \right)^\alpha \right)^{-1/2} \right]$$

En donde α es el coeficiente de difusión anómala.

5.12. Número y Brillo (N&B)

5.12.1. Obtención de datos experimentales

Las mediciones de N&B se realizaron sobre células 3617 en cultivo, transfectadas según se explicó en las secciones 5.3, 5.4 y 5.5. Se tomaron las medidas con un microscopio LSM 780 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, Estados Unidos), en las instalaciones de *LRBGE Optical Imaging Core* (NIH, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), configurado como se describió en la sección 5.11.1..

Para cada célula analizada, se adquirió una secuencia temporal de 150 imágenes consecutivas, de 256x256 píxeles y con un tamaño de píxel de 80 nm. Con estos parámetros, se logró capturar el plano central entero del núcleo en el campo. El tiempo de adquisición de cada píxel fue de 6.3 μ s, que corresponde a un tiempo suficientemente corto para que no haya recambio de moléculas en el volumen de observación confocal, según la dinámica del GR dentro del núcleo (Figura 7.2). El tiempo de adquisición de una imagen, y por lo tanto de re-

muestreo de un mismo píxel, fue de 0.97 s, que corresponde a un tiempo suficientemente largo para un recambio prácticamente total de moléculas en el volumen de observación (Figura 7.2). La duración de cada medición fue entonces de 146 s, tiempo en el cual no se registraron movimientos de deriva nuclear o celular.

Las mediciones *in vitro* de soluciones de fluoresceína se realizaron como control de la aplicación del método de N&B. Se hicieron en una gota de la solución sobre un cubreobjetos pretratado con NaOH 0.2 M durante 30 min, lavado posteriormente con H₂O bidestilada y finalmente secado. Se prepararon soluciones de fluoresceína en el rango de concentraciones 25-400 nM en una solución Tris-HCl 20 mM pH 8.5, glicerol 60%v/v.

5.12.2. Obtención de datos por simulaciones

Se realizaron simulaciones mediante la plataforma de simulaciones del programa SimFCS de experimentos de N&B en condiciones similares a las utilizadas experimentalmente. En particular, se simularon ~1000 moléculas con $D = 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y un brillo molecular de 10^5 cpms en una grilla de 64×64 píxeles², con un tamaño de píxel de 50 nm. Se tomaron 800 imágenes con un tiempo de adquisición de 8 μs por píxel.

El programa permite simular experimentos en dos colores ya que el usuario puede asignar el brillo de cada especie en dos canales distintos. De esta manera, a las especies puras se les asignó brillo únicamente en uno de los dos canales, mientras que a los heterocomplejos se les asignó brillo en ambos. La cantidad de moléculas de cada especie fue variable, dependiendo del caso específico de simulación, como se detalla en la siguiente sección.

5.12.2. 1. Cálculos accesorios para simulaciones

5.12.2.1.1. Cálculo de concentraciones en un sistema sencillo

Para las simulaciones de N&B en dos colores (2C-N&B) en un sistema sencillo de dimerización en que las moléculas *A* y *B* pueden homodimerizar o heterodimerizar entre sí, se calcularon previamente las concentraciones de cada uno de los tres tipos de dímeros: $[AA]$, $[AB]$ y $[BB]$. Se asumió una constante de asociación infinita, es decir, todas las moléculas se

encuentran formando dímeros. Además, se asumió igual constante de equilibrio para la formación de homo y heterodímeros, y por lo tanto las concentraciones de cada tipo de dímero sólo dependen de las concentraciones totales $[A]$ y $[B]$, según las siguientes ecuaciones:

Ecuación 5.14
$$[AA] = \frac{1}{2} ([A] + [B]) \left(\frac{[A]}{[A] + [B]} \right)^2$$

Ecuación 5.15
$$[BB] = \frac{1}{2} ([A] + [B]) \left(\frac{[B]}{[A] + [B]} \right)^2$$

Ecuación 5.16
$$[AB] = ([A] + [B]) \left(\frac{[A]}{[A] + [B]} \right) \left(\frac{[B]}{[A] + [B]} \right)$$

Las concentraciones de cada tipo de dímero, calculadas a partir de estas ecuaciones en un rango amplio de concentraciones de A y B , se utilizaron como parámetros de entrada en las simulaciones en SimFCS, según se muestra en la siguiente Tabla:

[AA]	[BB]	[AB]	[AA]	[BB]	[AB]	[AA]	[BB]	[AB]
5	0	0	0	40	0	0	160	0
10	0	0	1	36	9	0	155	10
20	0	0	2	32	16	1	151	19
40	0	0	7	27	27	2	142	36
80	0	0	20	20	40	8	128	64
160	0	0	53	13	53	80	80	160
320	0	0	128	8	64	213	53	213
0	20	0	284	4	71	0	320	0
1	16	8	0	80	0	0	315	10
3	13	13	0	75	9	0	310	19
10	10	20	1	71	18	1	301	38
27	7	27	4	64	32	4	284	71
64	4	32	13	53	53	53	213	213
142	2	36	40	40	80	256	16	128
301	1	38	107	27	107			

Tabla 5.3. Parámetros de entrada en simulaciones de 2C-N&B en un sistema de dimerización. Cantidad de moléculas AA , BB y AB simuladas para sistemas con cantidades variables de A y B totales.

5.12.2.1.2. Cálculo de concentraciones en un sistema complejo

Para las simulaciones de 2C-N&B en un sistema complejo, se consideró una reacción de asociación entre dos tipos de moléculas A y B (ambas fluorescentes en distinto rango espectral) formando un heterotrímero AB_2 , con constante de equilibrio K :



Ecuación 5.18 $K = \frac{[AB_2]}{[A][B]^2}$

Se calcularon las concentraciones de A , AB_2 y B de acuerdo a diferentes combinaciones de concentraciones totales de A (A_T) y B (B_T), en donde $A_T = [A] + [AB_2]$ y $B_T = [B] + 2[AB_2]$. A partir de la ecuación de equilibrio, la obtención de $[AB_2]$ requiere la resolución de la siguiente ecuación:

Ecuación 5.19 $0 = -4K[AB_2]^3 + 4K(A_T + B_T)[AB_2]^2 - (4KA_TB_T + KB_T^2 + 1)[AB_2] + KA_TB_T^2$

Es decir, la resolución de esta ecuación es el cálculo de las raíces de un polinomio de grado 3. Se diseñó una rutina en MATLAB para hallar la raíz real de este polinomio y de esta manera se determinó $[AB_2]$, mientras que $[A] = A_T - [AB_2]$ y $[B] = B_T - 2[AB_2]$. Esto se hizo para tres valores diferentes de K y concentraciones totales variables de A y B . Estas concentraciones se utilizaron como parámetros de entrada en las simulaciones de 2C-N&B, como se muestra en la siguiente Tabla.

K			10^*K			10000^*K		
[A]	[B]	[AB ₂]	[A]	[B]	[AB ₂]	[A]	[B]	[AB ₂]
9	38	1	5	30	5	0	20	10
18	36	2	12	24	8	2	4	18
36	32	4	29	18	11	20	0	20
74	28	6	67	14	13	60	0	20
152	24	8	145	10	15	140	0	20
309	18	11	304	8	16	300	0	20
627	14	13	623	6	17	620	0	20
7	74	3	2	64	8	0	60	10
14	68	6	6	52	14	0	40	20
30	60	10	18	36	22	2	4	38
65	50	15	52	24	28	40	0	40
139	38	21	128	16	32	120	0	40
295	30	25	285	10	35	280	0	40
611	22	29	604	8	36	600	0	40
3	146	7	0	140	10	0	140	10
7	134	13	1	122	19	0	120	20
17	114	23	4	88	36	0	80	40
45	90	35	24	48	56	3	6	77
112	64	48	93	26	67	80	0	80
263	46	57	248	16	72	240	0	80
577	34	63	566	12	74	560	0	80
1	302	9	0	300	10	0	300	10
2	284	18	0	280	20	0	280	20
5	250	35	1	242	39	0	240	40
17	194	63	3	166	77	0	160	80
62	124	98	32	64	128	3	6	157
199	78	121	174	28	146	160	0	160
506	52	134	489	18	151	480	0	160
0	620	10	0	620	10	0	620	10
1	562	39	0	560	40	0	560	40
12	344	148	2	324	158	0	320	160
84	168	236	41	82	279	4	8	316
21	62	9	11	42	19	0	20	30
30	100	30	12	64	48	0	40	60
36	152	84	11	102	109	0	80	120
1	462	19	0	460	20	0	460	20
2	424	38	0	420	40	0	420	40
6	352	74	1	342	79	0	340	80
69	138	131	35	70	165	4	8	196
488	16	12	483	6	17	480	0	20
472	24	28	464	8	36	460	0	40
422	44	78	408	16	92	400	0	100
34	208	146	7	154	173	0	320	40
69	158	171	31	82	209	0	240	80
121	122	179	85	50	215	0	160	120
230	20	10	224	8	16	0	200	150
216	32	24	206	12	34	0	170	40
190	50	50	175	20	65	0	90	80
134	88	106	108	36	132			
13	166	37	2	144	48			
41	122	59	16	72	84			
78	96	72	52	44	98			
5	310	45	1	302	49			
23	206	97	4	168	116			
7	364	93	1	352	99			

Tabla 5.4. Parámetros de entrada en simulaciones de 2C-N&B en un sistema complejo. Cantidad de moléculas A, B y AB₂ simuladas para sistemas con distinta constante de asociación (K) y cantidades variables de A y B totales.

5.12.3. Análisis de datos

Los datos de N&B consisten en una serie temporal de S imágenes. A continuación se describen la teoría y los cálculos detrás de los análisis de N&B [378], los cuales se realizaron con el programa SimFCS mencionado previamente.

Para cada píxel, se calculan la intensidad promedio ($\langle k \rangle$) y la varianza de intensidad (σ^2), a partir de los valores de cuentas de fluorescencia (k_i) en la serie temporal:

Ecuación 5.20
$$\langle k \rangle = \frac{\sum_i k_i}{S}$$

Ecuación 5.21
$$\sigma^2 = \frac{\sum_i (k_i - \langle k \rangle)^2}{S}$$

Para el caso de detectores con capacidad de conteo de fotones, la varianza σ^2 incluye las contribuciones de ruido estadístico (σ_d^2) y de variaciones en el número de ocupación (σ_n^2), es decir, en el número de moléculas en el volumen de observación [378]. Estas varianzas quedan definidas en función del brillo molecular (ε) y el número de ocupación (n):

Ecuación 5.22
$$\sigma_n^2 = \varepsilon^2 n$$

Ecuación 5.23
$$\sigma_d^2 = \varepsilon n$$

Ecuación 5.24
$$\langle k \rangle = \varepsilon n$$

El brillo molecular ε corresponde al número de fotones emitidos por segundo por una molécula cuando se encuentra en el centro del volumen de observación, y depende de la potencia del láser y de la eficiencia de detección del equipo [378]. El número de ocupación n es el número promedio de moléculas en el volumen de observación. Por ecuaciones 5.23 y 5.24, la varianza del detector es igual a la intensidad promedio.

Se definen los parámetros de brillo aparente (B) y número aparente (N) en función de las ecuaciones 5.22, 5.23 y 5.24 [378]:

Ecuación 5.25
$$B = \frac{\sigma^2}{\langle k \rangle} = \varepsilon + 1$$

Ecuación 5.26
$$N = \frac{\langle k \rangle^2}{\sigma^2} = \frac{\varepsilon n}{\varepsilon + 1}$$

De esta manera, se realizaron los cálculos de los parámetros N y B para cada píxel de la imagen. Para cada célula, se seleccionaron los píxeles correspondientes al núcleo a partir de las distribuciones de intensidad, ya que usualmente los píxeles del núcleo, el citoplasma y el fondo son claramente distinguibles en un gráfico de B vs. N (Figura 5.2A-B). En los casos en que no se pudo separar de esta forma la contribución del núcleo del citoplasma o del fondo, la selección se hizo con el cursor. En los datos provenientes de simulaciones, se seleccionaron todos los píxeles de la matriz.

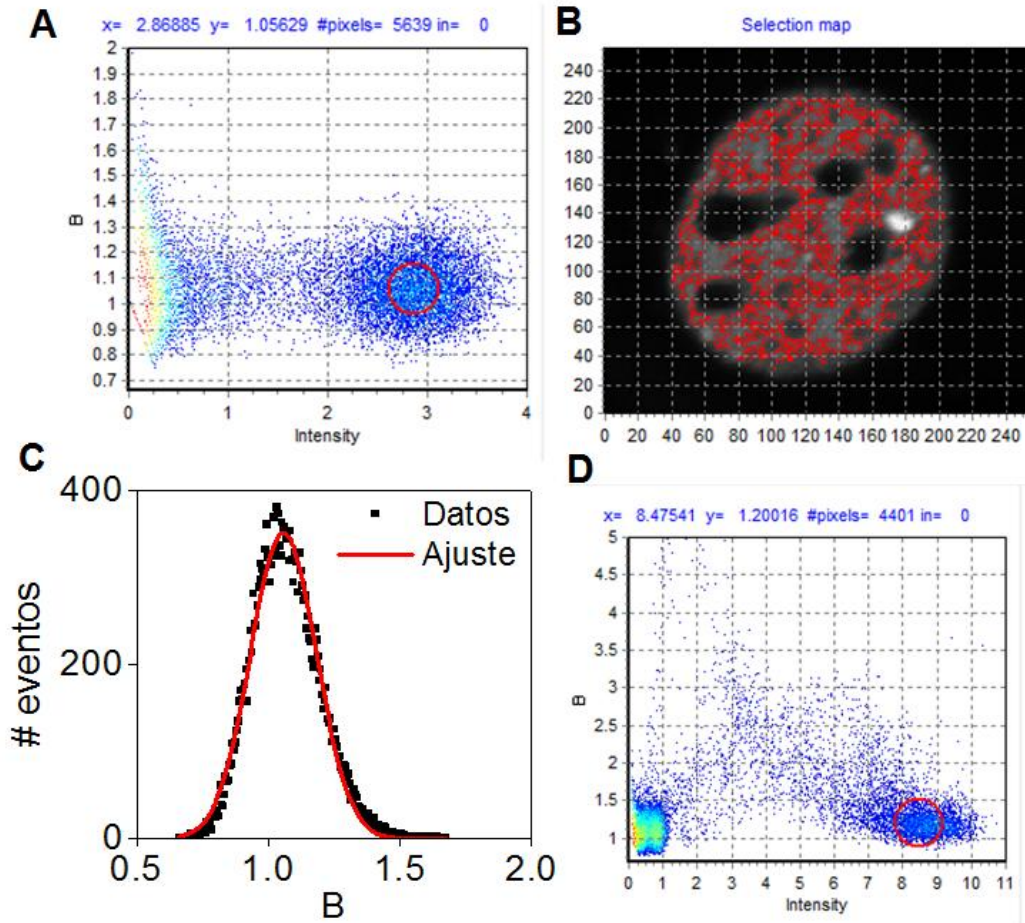


Figura 5.2. Análisis de datos de N&B. (A) El programa SimFCS brinda un gráfico de B vs. I para todos los píxeles de la imagen. Con el cursor (círculo rojo) se selecciona un conjunto de píxeles con un dado rango de valores de brillo e intensidad. (B) Imagen de la célula analizada en el panel A: los píxeles rojos son aquellos incluidos en el cursor rojo mostrado en el panel A. (C) Luego se realiza un histograma de B a partir de los píxeles seleccionados y se ajusta una función normal al histograma de datos. Se considera al valor medio de esta función como el B característico de la medición. (D) Gráfico de B vs. I calculado a partir de una medición en una célula que se movió considerablemente durante la adquisición de imágenes. Este movimiento se refleja en distorsiones en las nubes de valores del gráfico y la medición debe ser descartada.

Se ajustó una función normal a la distribución de B en los píxeles seleccionados (Figura 5.2C) y se consideró a la media de esta distribución como el valor característico de B en la medición. El brillo molecular promedio (ε) (Ecuación 5.25) de GFP o mCherry en el núcleo, obtenido a partir de mediciones en 30-40 células, se utilizó para normalizar el brillo de las proteínas de fusión a GFP o mCherry, y de esta manera poder representar el brillo en número de fluoróforos por molécula.

Se descartaron datos en los que existía un evidente movimiento global del núcleo o la célula. Estas variaciones son apreciables tanto al observar la secuencia temporal de imágenes, como al realizar el análisis de B ya que contribuyen a una mayor varianza de intensidad, fenómeno que es fácilmente detectado en las matrices B vs. I (Figura 5.2D).

5.12.4. Predicción teórica de ensayos de 2C-N&B

Se consideró un sistema como el que se presentó en la sección 5.12.2.1.2. Se calcularon las concentraciones de cada especie en el equilibrio como se detalla en dicha sección y luego se realizaron los cálculos teóricos de brillo molecular en el canal de detección de B (ε_B) según la siguiente ecuación:

Ecuación 5.27

$$\varepsilon_B = \frac{[B]\varepsilon_M^2 + [AB_2](2\varepsilon_M)}{[B]\varepsilon_M + [AB_2]2\varepsilon_M}$$

ε_M corresponde al brillo molecular de B monomérico y se le asignó un valor de 0.35 en los cálculos para obtener valores similares a los obtenidos en simulaciones.

5.13. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como las medias con sus errores estándar. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.). Estos análisis consistieron en estudios de ANOVA de un factor seguidos de pruebas *post-hoc* de Tukey para comparaciones múltiples o de Dunnett para comparaciones de varios tratamientos contra un control. Se corroboraron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad mediante las pruebas de Bartlett y Lilliefors, respectivamente. En experimentos en los cuales se comparó un tratamiento contra un control se realizaron pruebas t de Student.

En el experimento en que se analizó el reclutamiento de GFP-GR al arreglo MMTV en distintas condiciones (sección 7.7.1), se utilizó el procedimiento de comparaciones múltiples de Marascuilo [379]. Este procedimiento no requiere conocer la dispersión de los datos (error o desvío estándar).

Inicialmente, se calculó p_i ($i=1, 2, \dots, k$) de k condiciones como la fracción de células observadas que presentaban un arreglo MMTV visible en la condición i . Se realizó una prueba de homogeneidad de chi-cuadrado (χ^2) para determinar si las proporciones p_i eran iguales entre sí o no. Luego de rechazar la hipótesis nula de homogeneidad, se computaron las diferencias entre proporciones $p_i - p_j$ para cada par posible y se compararon con un valor crítico r_{ij} :

Ecuación 5.28

$$r_{ij} = \sqrt{\chi^2_{1-\alpha, k-1}} \sqrt{\frac{p_{array,i}(1-p_{array,i})}{n_i} + \frac{p_{array,j}(1-p_{array,j})}{n_j}}$$

Donde n es el tamaño de la muestra (cantidad de células observadas) en cada condición (i,j) y $\chi^2_{1-\alpha, k-1}$ es el valor crítico de la distribución de χ^2 , para un nivel de significancia de α y $k-1$ grados de libertad. Si $p_i - p_j > r_{ij}$ entonces p_i y p_j son significativamente diferentes.

En todos los casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$. Letras distintas y del mismo tipo (minúsculas, mayúsculas, griegas, números romanos) indican diferencias significativas entre los tratamientos en pruebas de Tukey. Si los datos presentan letras de distinto tipo esto implica que no se compararon entre sí. Los asteriscos indican diferencias significativas de un tratamiento respecto del control en pruebas de Dunnett o t de Student.

Resultados:

6. Distribución espacial del GR

La mayoría de los TF no se distribuye espacialmente de manera homogénea dentro del núcleo, lugar donde ejercen su actividad regulatoria de la transcripción. Por el contrario, y tal como se describió en el capítulo 1, se acumulan en múltiples dominios focales denominados *foci* [63, 380]. Esta distribución ha sido descrita no sólo para el GR sino también para otros SR y sus correguladores [348, 352-356, 381-383]. Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos moleculares que subyacen la formación y estructura de estos *foci*, así como su función [352].

Con el objetivo de responder estas preguntas pendientes, en este capítulo se analizó la distribución espacial del GR y su coactivador NCoA-2 dentro del núcleo, y se evaluó si esta distribución puede ser afectada por distintos ligandos glucocorticoides o mutaciones en el receptor. Para ello, se utilizaron diversas técnicas de microscopía de fluorescencia sobre células transfectadas de manera transitoria con vectores de expresión que codifican para las proteínas de interés fusionadas a proteínas fluorescentes.

6.1. Distribución intranuclear del GR

Con el objetivo de estudiar la distribución espacial del GR dentro de la célula y, en particular, dentro del núcleo, se adquirieron imágenes de microscopía confocal de células BHK que expresaban transitoriamente el receptor fusionado a la proteína fluorescente verde GFP. La Figura 6.1 muestra la distribución de GFP-GR en células no estimuladas y en células tratadas con el agonista dexametasona (Dex).

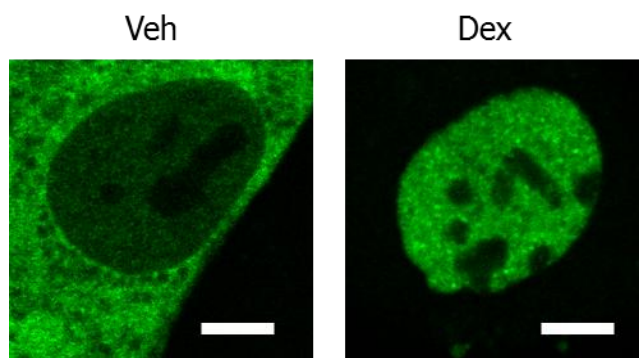


Figura 6.1. Distribución subcelular y subnuclear de GR. Células BHK fueron transfectadas con GFP-GR y tratadas con vehículo (Veh) o Dex. Escala: 5 μ m.

En su forma inactiva, el GR se encuentra localizado principalmente en el citoplasma, y la fracción nuclear se distribuye de manera homogénea en este compartimento (Figura 6.1). La activación hormonal del receptor provoca su translocación al núcleo y la formación de múltiples y pequeños *foci* subnucleares [348, 349] (Figura 6.1).

Cuando se utilizan proteínas de fusión en condiciones de sobreexpresión transitoria (como se hizo en este trabajo de Tesis) debe prestarse especial atención a la integridad estructural y funcional de la proteína de interés, en comparación al comportamiento de la proteína endógena en condiciones fisiológicas. Para corroborar que el modelo de sobreexpresión utilizado posee propiedades similares a las del sistema endógeno, se realizaron diversos experimentos control cuyos resultados se discuten brevemente a continuación.

Por un lado, se observó que la distribución subnuclear de GR en *foci* puede revertirse luego del lavado de la hormona, como se verá más adelante (Figura 6.5B). Cabe hacer notar también que la sobreexpresión del GFP-GR no induce *per se* su translocación al núcleo, y que esta particular distribución subnuclear en *foci* puede ser controlada según el ligando unido al receptor [270, 349, 350, 357] (Figura 6.1). Además, la formación de *foci* se visualizó por inmunodetección del receptor endógeno, en líneas celulares y en tejido vivo [348]. El conjunto de estas evidencias muestra que los *foci* observados no son agregados artificiales irreversibles debidos a la sobreexpresión del GR.

Por otra parte, las evidencias también sostienen que la sobreexpresión de GR fusionado a una proteína fluorescente tampoco afecta su capacidad de homodimerización. Se ha observado que la dimerización es dependiente de ligando, reversible e independiente del nivel de expresión del receptor [169, 270]. Por lo tanto, la sobreexpresión no produce una multimerización aberrante del receptor.

Por último, se demostró que GFP-GR puede inducir la expresión de genes que responden a GC y que esta inducción no ocurre *per se* sino que depende de la expresión de coactivadores y del uso de distintos ligandos [270, 364, 384]. A fin de verificar la funcionalidad de GFP-GR en condiciones de sobreexpresión en nuestro modelo experimental, se evaluó su capacidad de inducir la expresión de genes que responden a GC en células BHK transfectadas con las mismas concentraciones de plásmidos que se usaron para los ensayos de microscopía y estimuladas con Dex 10 nM. Para ello se determinó la capacidad transcripcional del GR

mediante cotransfección de un plásmido conteniendo el gen de la luciferasa bajo el control del promotor MMTV, que contiene cinco GRE. La Figura 6.2 muestra los resultados obtenidos.

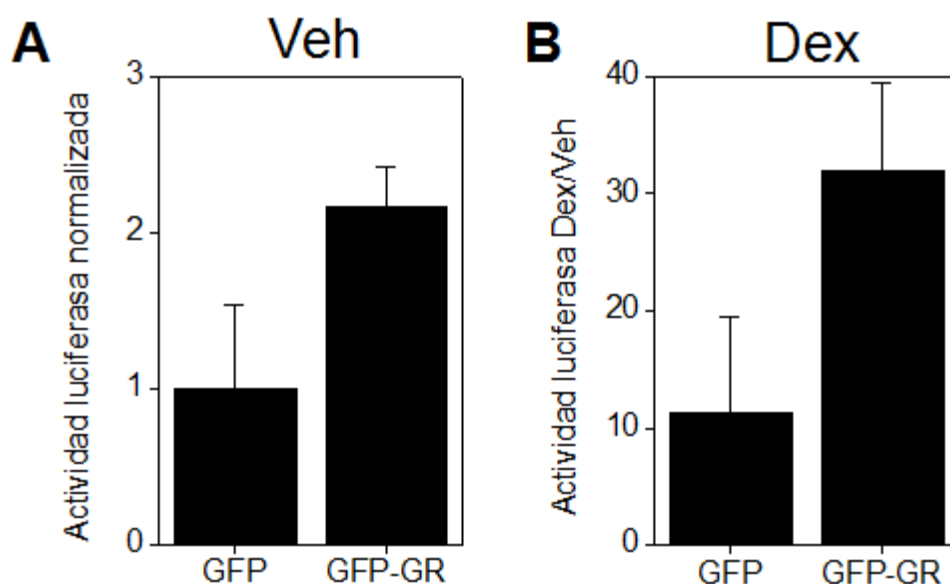


Figura 6.2. Análisis de gen reportero: efecto de la sobreexpresión de GFP-GR sobre su actividad transcripcional. Células BHK se transfectaron con lacZ, MMTV-luciferasa y GFP o GFP-GR. Luego las células se trataron con Veh (A) o Dex (B) por 18 h y se determinó la actividad luciferasa. Esta actividad se relativizó por la actividad β -galactosidasa. (A) Los valores se expresan normalizados por la actividad de células control transfectadas con GFP. (B) Los valores se expresan en cada caso respecto a su control. No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos que se muestran en cada gráfico.

La sobreexpresión *per se* de GFP-GR no aumentó significativamente la expresión del gen reportero en células no estimuladas (Figura 6.2A). Además, la inducción por Dex en células transfectadas con GFP-GR no fue mayor que la detectada en células que solamente expresaban el GR endógeno (Figura 6.2B). Estos resultados indican que la función transcripcional de GFP-GR transfectado transitoriamente en las células BHK es dependiente de ligando y que la magnitud de su actividad es comparable a la del receptor endógeno

El conjunto de las evidencias presentadas en esta sección indica que la expresión transitoria de GR fusionado a GFP en células BHK constituye un modelo adecuado para estudiar el comportamiento del receptor en células vivas.

6.2. Influencia de la conformación del GR en su distribución intranuclear

Con el objetivo de estudiar la capacidad del GR de formar *foci* en distintas condiciones, se adquirieron y analizaron imágenes de microscopía confocal de células BHK expresando transitoriamente GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon y tratadas con Veh, Dex ó 21-OH. El uso de mutantes u otros ligandos brinda herramientas que permiten ensayar distintas conformaciones posibles del receptor. Los mutantes GRdim y GRmon fueron descriptos en la secciones 2.6 y 2.7, respectivamente, mientras que se detalló las propiedades del ligando 21-OH en la sección 2.8.2.

Un análisis de este tipo requiere un enfoque cuantitativo para determinar si la formación de *foci* es mayor o menor en distintas condiciones ensayadas. En trabajos previos, la formación de *foci* fue analizada mediante el cálculo del coeficiente de variación de intensidad [270, 349]; sin embargo, este parámetro refleja el nivel de heterogeneidad en la distribución espacial pero puede no estar relacionado directamente con la cantidad de *foci*.

Por estos motivos, se decidió utilizar un método que permitiera contar la cantidad de *foci*, al menos de manera relativa. Dado que la relación señal/ruido de los *foci* fue baja y que el fondo (el nucleoplasma) presenta intensidades variables, no fue posible aplicar un método clásico de conteo de partículas por selección de un único umbral. Por el contrario, se eligió una aplicación del software Ilastik, que permite contar partículas en entornos heterogéneos [370]. La identificación de *foci* se basa en la comparación de la señal de un píxel con la de píxeles vecinos, para hallar máximos locales. Al finalizar el proceso, se obtuvo para cada imagen de entrada una imagen binaria de salida con los píxeles que conformaban los *foci* identificados (Figura 6.3).

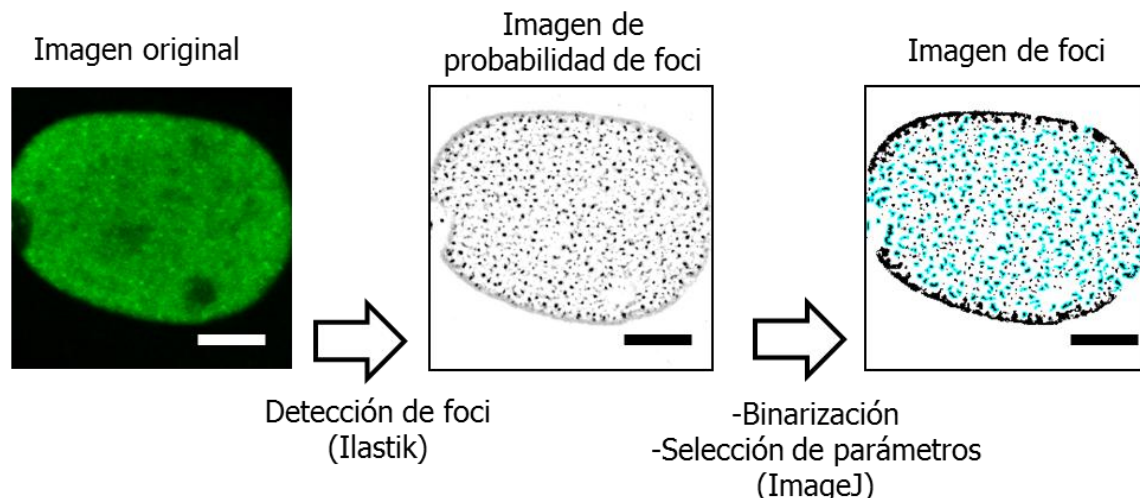


Figura 6.3. Esquema utilizado para cuantificar la densidad de *foci*. Se realizó la detección de *foci* con el software Ilastik y se obtuvo de esta manera una imagen representando la probabilidad de encontrar *foci* en cada píxel. Esta imagen fue binarizada en ImageJ y se identificaron los *foci* mediante la función “contador de partículas”.

Debe destacarse que, dada la distribución aparentemente al azar de los *foci*, se asumió que la distribución superficial de *foci* en el plano observado era representativa de la distribución volumétrica en todo el núcleo. Por otra parte, el objetivo fue obtener valores relativos de densidades de *foci*, no densidades volumétricas absolutas.

En la Figura 6.4 se representan las densidades superficiales de *foci* en las distintas condiciones analizadas. La figura ilustra que la capacidad del GR de formar *foci* intranucleares puede ser modulada por distintos ligandos o mutantes del receptor [349]. En concordancia con resultados anteriores, 21-OH indujo la formación de una menor densidad de *foci* que la inducida por Dex [270]. El mutante GRmon también mostró una capacidad reducida de formar *foci*, mientras que el mutante GRdim no presentó diferencias respecto del receptor salvaje. Si bien el GR inactivo se encuentra en baja concentración nuclear y el 21-OH induce un nivel de translocación algo menor que Dex, para evitar efectos debidos a diferencias de concentración se eligieron, en todas las condiciones, células que presentaban un rango acotado de intensidades ($40 < \text{señal/fondo} < 100$).

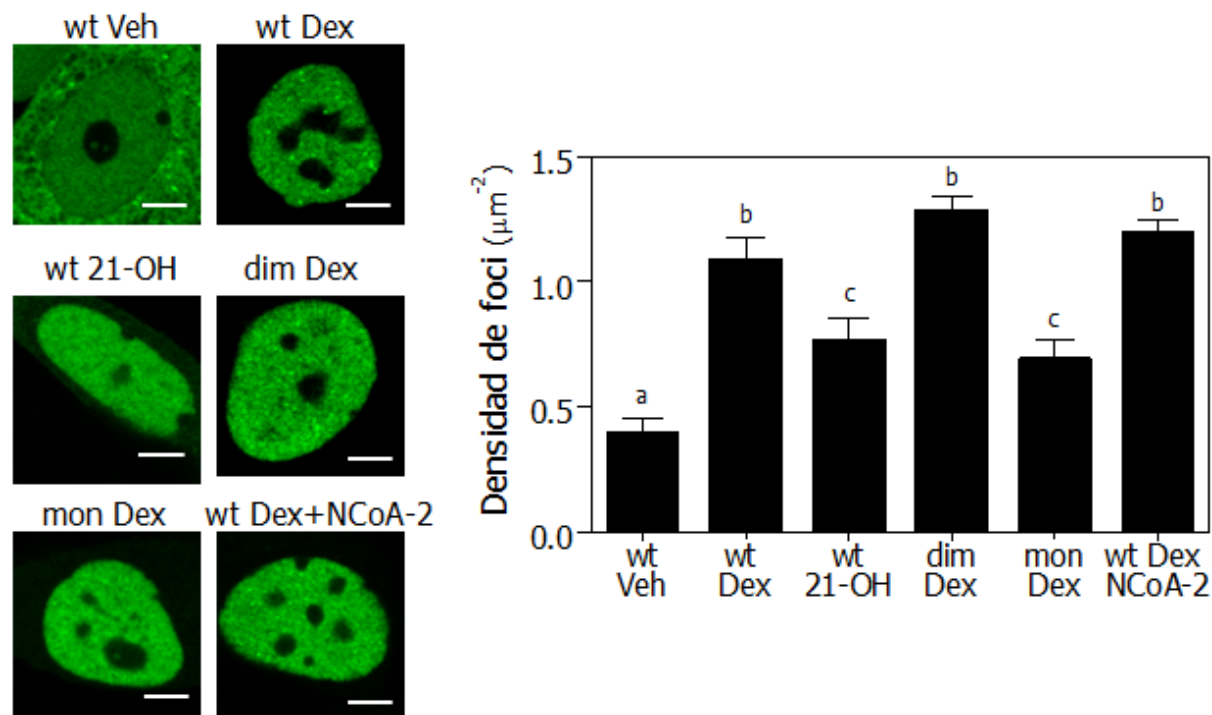


Figura 6.4. Densidades nucleares de foci. Células BHK fueron transfectadas con GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon, y tratadas con Veh, Dex o 21-OH. También se co-expresó mCherry-NCoA-2 cuando se indica. Se muestran imágenes representativas (escala: 5 μm). Se determinó la densidad de foci en el plano central del núcleo en las diferentes condiciones. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.3. Distribución intranuclear de GR y el coactivador NCoA-2

Además de los TF, otros componentes involucrados en la regulación de la actividad transcripcional presentan una distribución focal en el núcleo. Este fenómeno se ha observado para varios correguladores de SR [381, 383, 385], en particular para NCoA-2 [381, 382, 385, 386], un coactivador relevante del GR. Con el fin de evaluar la distribución intranuclear de este coactivador y su potencial vínculo con la distribución del receptor, se adquirieron imágenes de microscopía confocal en células BHK que expresaban mCherry-NCoA-2 en presencia o ausencia de GFP-GR (Figura 6.5).

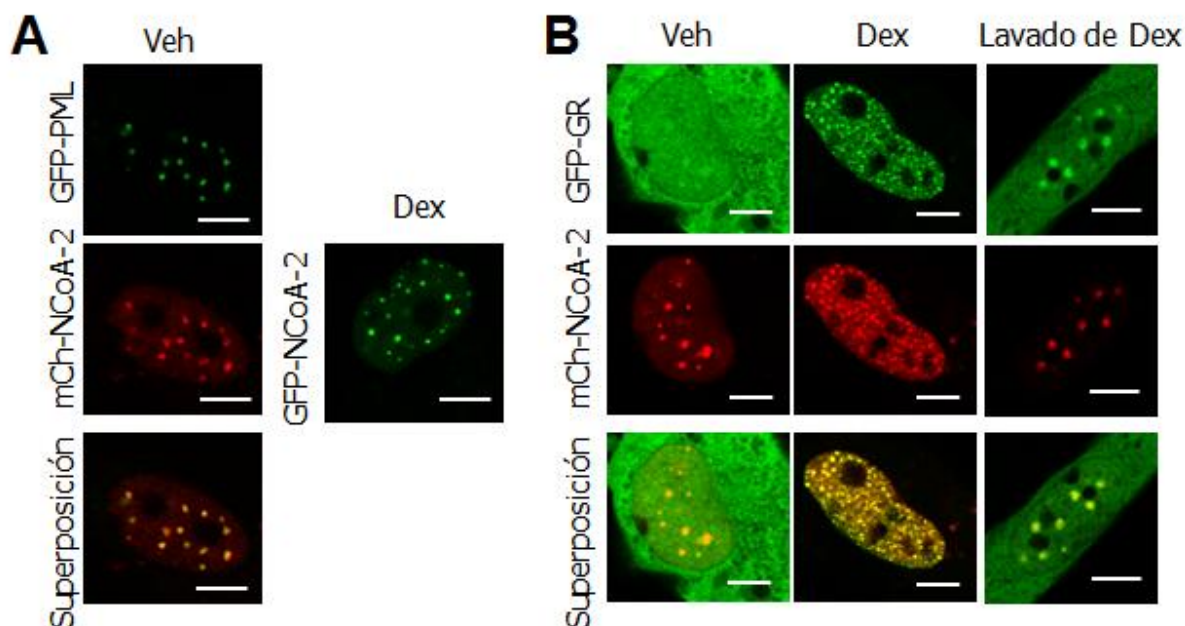


Figura 6.5. Distribución espacial de GR y NCoA-2. Células BHK se transfectaron con mCherry-NCoA-2 y GFP-PML o GFP-NCoA-2 solo (**A**), mCherry-NCoA-2 y GFP-GR (**B**) y se trataron con Veh o Dex. La columna "lavado de Dex" muestra imágenes obtenidas luego de incubar células tratadas con Dex en medio sin hormona. Se muestran imágenes representativas de cada condición (escala: 5 μ m).

Se observó que el coactivador forma grandes y pocos cuerpos subnucleares en células no estimuladas (Figura 6.5A). La colocalización de estos dominios focales con PML-GFP permitió identificar estas estructuras como cuerpos PML (Figura 6.5A), en acuerdo con la literatura [382]. Sin embargo, en células coexpresando GFP-GR, la activación del receptor con Dex indujo una drástica redistribución intranuclear no sólo del GR sino también del coactivador, que pasó a mostrar una distribución en *foci* muy similar a la del GR (Figura 6.5B). De hecho, los *foci* formados por ambas proteínas colocalizaron. Esta redistribución fue revertida luego de la remoción de la hormona del medio de cultivo (Figura 6.5B), aunque el GR permaneció localizado parcialmente en los cuerpos PML. La redistribución de NCoA-2 dependiente de la activación hormonal del GR desde los cuerpos PML a pequeños y numerosos *foci* no fue observada en células que no coexpresaban el receptor (Figura 6.5A). Si bien las células BHK presentan GR endógeno, el hecho de que la redistribución de NCoA-2 requiera niveles de expresión de GR relativamente similares sugiere que el fenómeno dependería de la interacción entre GR y NCoA-2. Además, la coexpresión de NCoA-2 no modificó significativamente la

densidad de *foci* de GR en células estimuladas con Dex (Figura 6.4), es decir que la propiedad de ser reclutado a estos *foci* parecería ser intrínseca del receptor.

A continuación, se evaluó si este fenómeno de redistribución del coactivador frente a la estimulación hormonal se reproducía en las otras condiciones ensayadas. Para ello, se adquirieron imágenes confocales de células BHK que expresaban mCherry-NCoA-2 y GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon y que fueron tratadas con Dex ó 21-OH (Figura 6.6).

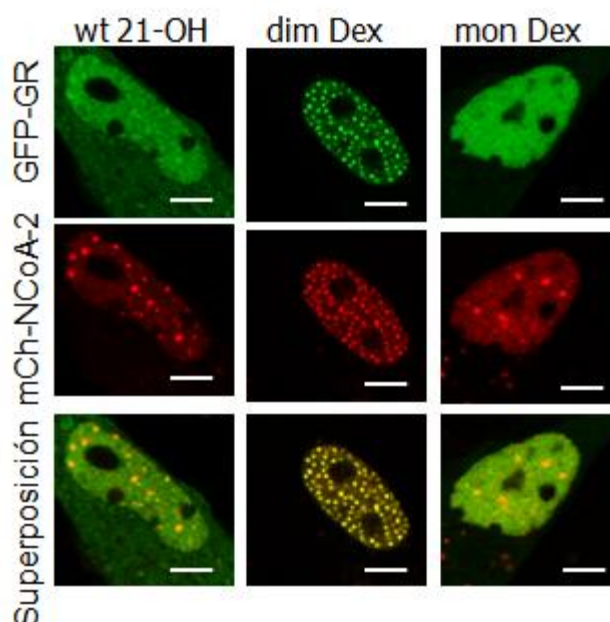


Figura 6.6. Distribución de GR y NCoA-2. Células BHK fueron transfectadas con mCherry-NCoA-2 y GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon, y tratadas con Dex ó 21-OH. Se muestran imágenes representativas de cada condición (escala: 5 μ m).

Notoriamente, en las condiciones en que se observó una baja densidad de *foci*, no se observó una redistribución subnuclear de NCoA-2 y este coactivador permaneció en los cuerpos PML. Esto se observó cuando se utilizó la mutante GRmon o el receptor salvaje unido al ligando 21-OH (Figura 6.6). Teniendo en cuenta que este ligando no favorece la interacción entre GR y NCoA-2 [387], este resultado apoya la idea de que esta redistribución requiere de la interacción entre el receptor y su coactivador. El comportamiento de GRdim/Dex fue similar al de GR/Dex, ya que se detectó su colocalización con múltiples *foci* de NCoA-2 en el núcleo (Figura 6.6).

Con el fin de validar la adecuada funcionalidad del coactivador en nuestro modelo experimental, se ensayó la capacidad de NCoA-2 de favorecer la actividad transcripcional del GR en células BHK transfectadas con las mismas concentraciones de los plásmidos de GFP-GR y mCherry-NCoA-2 utilizadas en experimentos de microscopía, y estimuladas con Dex (Figura 6.7).

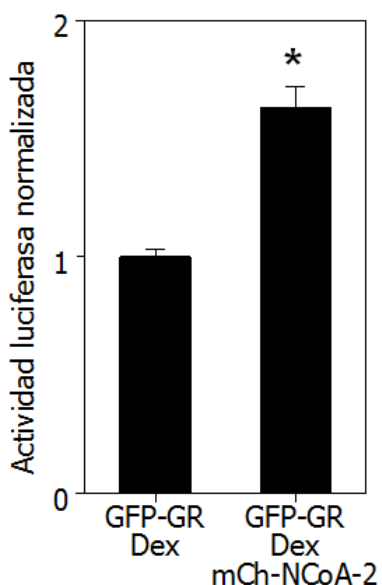


Figura 6.7. Efecto de la sobreexpresión del coactivador NCoA-2 sobre la actividad transcripcional del GR. Células BHK se transfectaron con lacZ, MMTV-luciferasa, GFP-GR y mCherry o mCherry-NCoA-2. Luego las células se trataron con Dex por 18 h y se determinó la actividad luciferasa. Esta actividad se relativizó por la actividad β -galactosidasa. Los valores se expresan normalizados por la actividad de células no cotransfectadas con mCherry-NCoA-2. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto del control.

En estas condiciones, la coexpresión del coactivador aumentó en un 63% la actividad de luciferasa bajo el control del promotor MMTV (Figura 6.7). Por lo tanto, NCoA-2 ejerce su función como coactivador del GR en las condiciones experimentales examinadas.

6.4. Evolución temporal de la redistribución intranuclear de GR y NCoA-2

Con el objetivo de caracterizar la dinámica del proceso de redistribución subcelular y subnuclear de GR y NCoA-2 a partir del estímulo hormonal, se tomaron secuencias temporales de imágenes por microscopía confocal de células BHK individuales expresando transitoriamente GFP-NCoA-2 y mCherry-GR, desde el agregado de Dex al medio de cultivo (Figura 6.8). Esta redistribución es un proceso rápido, que involucra cambios apreciables en menos de 15 min.

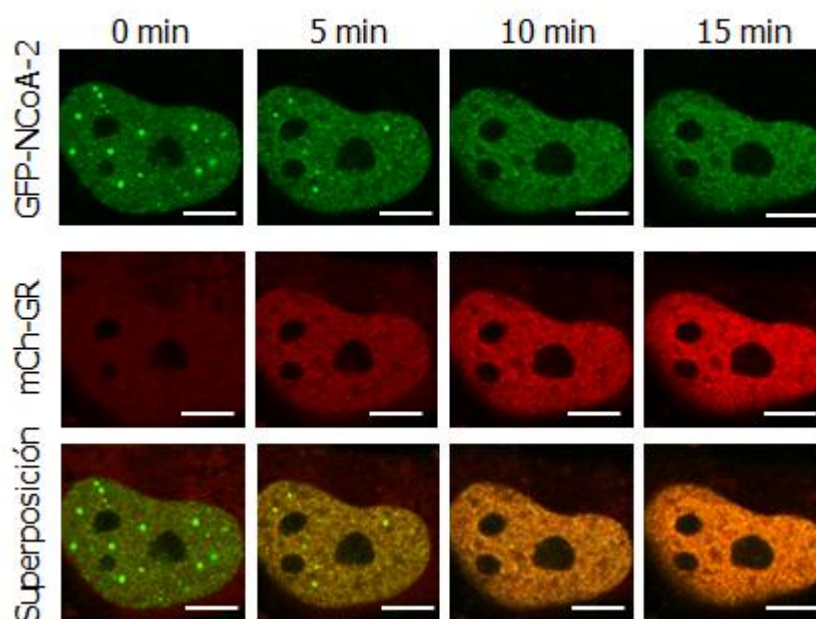


Figura 6.8. Evolución temporal de la redistribución de GR y NCoA-2. Células BHK se transfectaron con GFP-NCoA-2 y mCherry-GR y trataron con Dex en el tiempo = 0 min. Se muestran imágenes a distintos tiempos de una célula representativa (escala: 5 µm).

Para analizar cuantitativamente la evolución de la distribución espacial de ambas proteínas, se procesaron las imágenes y se determinaron, para GFP-NCoA-2 y mCherry-GR: (i) la intensidad de fluorescencia en el núcleo, (ii) la densidad superficial de *foci* en el núcleo (según se explicó en la sección 6.2), (iii) el grado de colocación entre *foci* (determinado como se explica en la sección 5.10) , y (iv) la intensidad promedio de los *foci* (Figura 6.9).

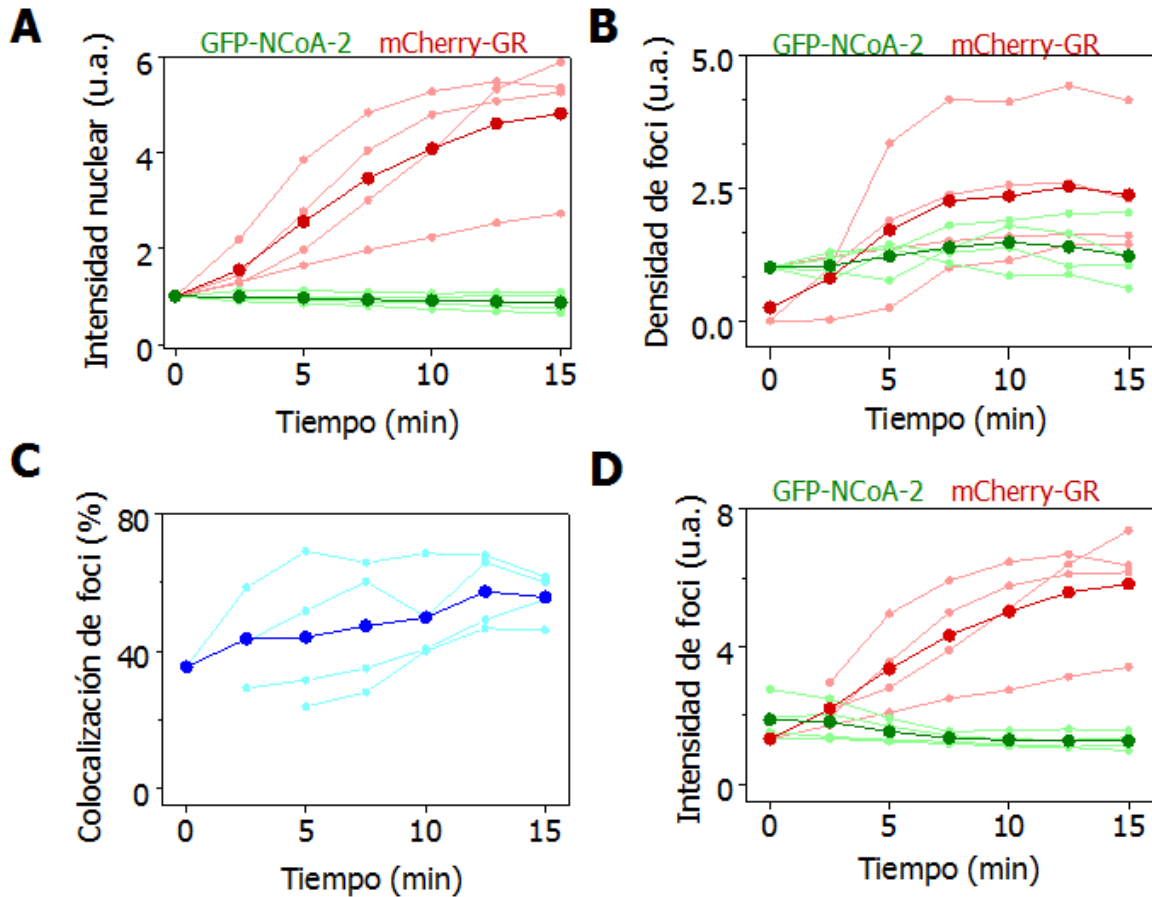


Figura 6.9. Parámetros cuantitativos de la evolución temporal de la redistribución de GR y NCoA-2. Células BHK fueron transfectadas con GFP-NCoA-2 y mCherry-GR y tratadas con Dex en el tiempo = 0 min. A partir de las imágenes obtenidas se calcularon diferentes parámetros para ambas proteínas en los distintos tiempos: la intensidad nuclear promedio (A), la densidad nuclear de *foci* (B), el grado de colocalización entre *foci* de ambas proteínas (C) y la intensidad de *foci* (D) (n=4). Las líneas tenues y finas representan los parámetros determinados en células individuales, mientras que las líneas oscuras y gruesas representan los valores promedio de estos parámetros.

La concentración nuclear de GR, proporcional a la intensidad de fluorescencia, aumentó debido a la translocación del receptor desde el citoplasma al núcleo, inducida por la unión de Dex. Por el contrario, la concentración nuclear de NCoA-2 se mantuvo constante (Figura 6.9A).

La estimulación con Dex indujo a su vez un marcado aumento en la densidad relativa de *foci* intranucleares de GR hasta alcanzar un *plateau* en ~8 min (Figura 6.9B). En el caso de NCoA-2, no se observó un marcado aumento en la densidad de *foci* (Figura 6.9B) pero sí hubo un aumento progresivo de la colocalización de estos *foci* con los formados por el GR (Figura

6.9C). Estos resultados probablemente sean consecuencia de que el proceso de redistribución del coactivador involucra la desaparición de grandes *foci* identificados como cuerpos PML y la formación de otro tipo de *foci*, más pequeños. Es preciso destacar que el porcentaje de colocalización determinado (55%) (Figura 6.9C) entre los *foci* de GR y NCoA-2 es significativo ya que simulaciones en que se dispusieron *foci* al azar en iguales densidades que en los experimentos arrojaron una colocalización del 12%.

La intensidad de fluorescencia promedio de los *foci* de GR aumentó de manera sostenida en el lapso de tiempo estudiado, indicando que los *foci* siguieron incorporando moléculas de GR a medida que progresaba la translocación nuclear del receptor (Figura 6.9D). Este resultado sugiere que estas estructuras no tienen capacidad limitada para unir una cantidad fija de moléculas, sino que admiten una estequiometría variable, al menos en la escala temporal medida (15 min). La intensidad promedio de los *foci* de NCoA-2, en cambio, disminuyó a lo largo de la secuencia temporal ya que los cuerpos PML acumulan una mayor concentración focal del coactivador que los *foci* formados a partir de la redistribución inducida por Dex (Figura 6.9D).

6.5. Caracterización bioquímica estructural de los *foci* de GR y NCoA-2

En el núcleo, la organización espacial de los distintos componentes en diferentes subcompartimentos o dominios requiere de algún soporte estructural, que puede tener distinta naturaleza bioquímica: ya sea ADN, ARN, proteínas o alguna combinación de los mismos. Los protocolos de digestión *in situ* por nucleasas permiten distinguir si estructuras de interés dependen de la integridad estructural de los ácidos nucleicos [382, 388]. Si bien las estructuras resistentes a digestión por nucleasas se asociaron con la “matriz nuclear”, la misma existencia de una estructura de este tipo en el núcleo fue cuestionada posteriormente [389, 390]. En todo caso, la resistencia a la digestión por nucleasas se podría asumir como indicativa de un soporte estructural de naturaleza proteica.

Con el fin de analizar la naturaleza bioquímica del soporte estructural de los *foci*, se llevó a cabo un protocolo de digestión por DNasa I o RNasa A *in situ* en células BHK que expresaban transitoriamente GFP-GR y la histona H2B-mCherry y fueron estimuladas con Dex. Las células se fijaron con PFA, se permeabilizaron con Tritón X-100, se trataron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

y finalmente se sometieron a la digestión con nucleasas, como se explica en la sección 5.6. Los resultados obtenidos luego de este protocolo de digestión se muestran en la Figura 6.10.

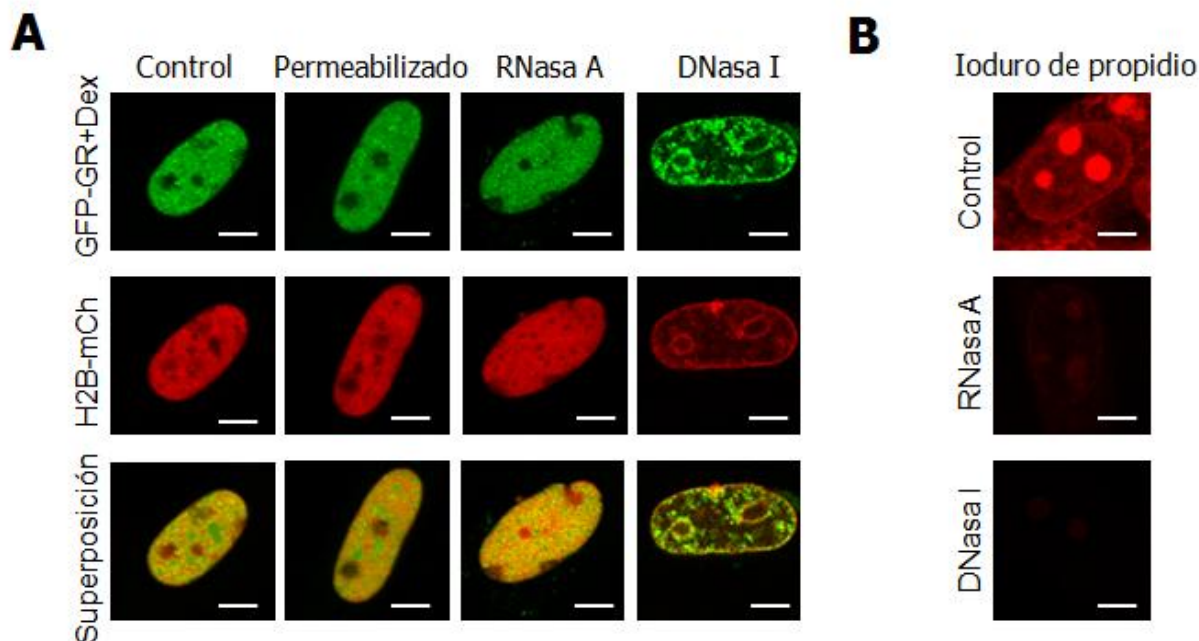


Figura 6.10. Digestión por nucleasas *in situ*. Células BHK se transfectaron con GFP-GR y H2B-mCherry **(A)** y trataron con Dex. Luego se fijaron, permeabilizaron y digirieron *in situ* con RNasa A o DNasa I. Se muestran imágenes representativas (escala: 5 μ m). En el experimento que se muestra en **(B)** las células se tiñieron con ioduro de propidio.

La organización subnuclear del GR se mantuvo intacta luego de la digestión con RNasa A (Figura 6.10A). Por el contrario, el tratamiento con DNasa I eliminó la mayor parte del GR nuclear, con excepción de grandes agregados perinucleares y perinucleolares. Este patrón de distribución coincidió con el presentado por la histona H2B-mCherry luego de la digestión, sugiriendo la existencia de cromatina altamente condensada e inaccesible a la acción de la DNasa I (Figura 6.10A). La actividad de la RNasa A fue corroborada *in situ* mediante tinción con ioduro de propidio antes y después de la digestión (Figura 6.10B). Estos resultados sugieren que la organización intranuclear del GR en *foci* requiere estructuralmente la integridad del ADN pero no del ARN.

Para evaluar la naturaleza bioquímica del soporte estructural de los cuerpos PML/NCoA-2 y de los *foci* integrados por GR y NCoA-2, se realizaron experimentos similares en células BHK que coexpresaban GFP-GR y mCherry-NCoA-2 (Figura 6.11).

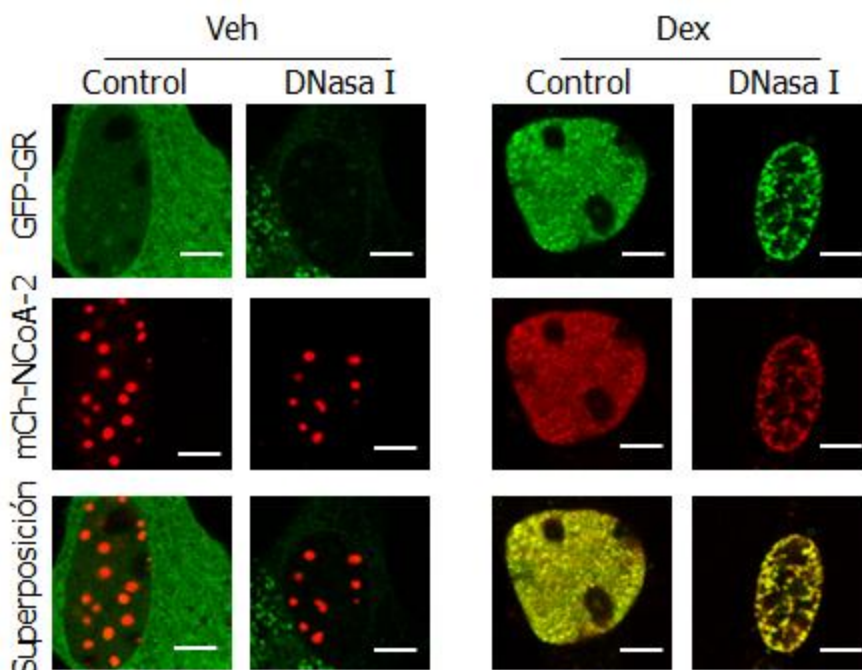


Figura 6.11. Digestión por nucleasas *in situ*. Células BHK se transfectaron con GFP-GR y mCherry-NCoA-2 y se trataron con Veh o Dex. Luego se fijaron, permeabilizaron y digirieron con DNasa I. Se muestran imágenes representativas (escala: 5 μ m).

En células estimuladas con Dex, nuevamente la digestión con DNasa I perturbó la distribución en *foci* del GR y del NCoA-2, presentando patrones de codistribución entre ambos factores, asociados a grandes porciones de cromatina no digerida (Figura 6.11). Sin embargo, en concordancia con la literatura [382], los cuerpos subnucleares de NCoA-2 en células no estimuladas resultaron resistentes a la digestión con DNasa I (Figura 6.11).

Se ha descrito que el soporte estructural de los cuerpos PML es principalmente proteico [73, 75], aunque se ha encontrado también ADN satélite en éstos [71]. En suma, estos resultados muestran que la localización del GR y del NCoA-2 inducida hormonalmente ocurre en subcompartimentos de distinto aspecto y constitución bioquímica que los observados para NCoA-2 en ausencia de estímulo hormonal.

6.6. Dinámica de GR y NCoA-2 en los *foci*

Los dominios focales y cuerpos subnucleares no son estructuras estáticas, fijas, sino por el contrario muy dinámicas, de manera que existe un constante intercambio de material entre ellos y el nucleoplasma.

Como se introdujo en la sección 3.1.2, FCS permite capturar la dinámica de biomoléculas en células vivas con alta resolución temporal y espacial. Sin embargo, los experimentos de FCS de punto único (en una posición fija) no permiten estudiar la dinámica en los *foci* ya que estas estructuras poseen cierta movilidad; como consecuencia, durante mediciones de larga duración se producen variaciones en la intensidad de fluorescencia debidos a la movilidad propia del *focus* en su conjunto y no al intercambio de moléculas fluorescentes (Figura 6.12). Esto generaría artefactos en las funciones de autocorrelación calculadas por FCS.

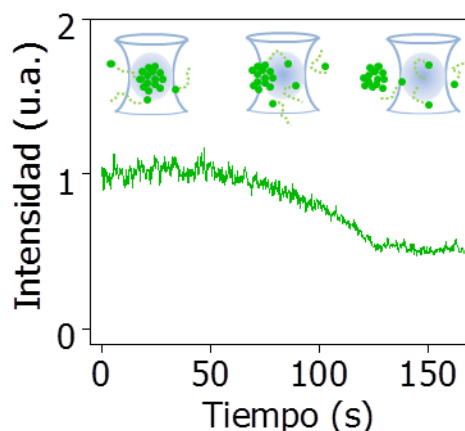


Figura 6.12. FCS de punto único sobre un *focus*. Se muestra la traza temporal de intensidad de fluorescencia en una medida de FCS de punto único sobre un *focus*, tomada en células BHK transfectadas con GFP-GR y tratadas con Dex.

Para capturar la dinámica de GR y NCoA-2 en los *foci*, se utilizó entonces otro abordaje experimental: FCS de barrido (Figura 6.13). En células BHK que expresaban GFP-NCoA-2 y mCherry-GR y que fueron estimuladas con Dex, se barrieron órbitas a través de *foci* y se obtuvo para cada medida una matriz de intensidad de fluorescencia en función del tiempo y la posición. Sobre esta matriz se determinó la trayectoria del *focus* mediante una rutina de

seguimiento y se compensó de esta manera el leve movimiento de los *foci* en la dirección de barrido. A partir de la traza temporal de intensidad de fluorescencia del *focus* se calcularon las funciones de autocorrelación (ACF) y de correlación cruzada (CCF) (Figura 6.13). Las ACF describen la dinámica de las moléculas detectadas por separado en cada canal (*i.e.* GFP-NCoA-2 y mCherry-GR), mientras que la CCF describe la dinámica de los heterocomplejos formados por estas dos moléculas. El cálculo de estas funciones se explica en la sección 5.11.3.

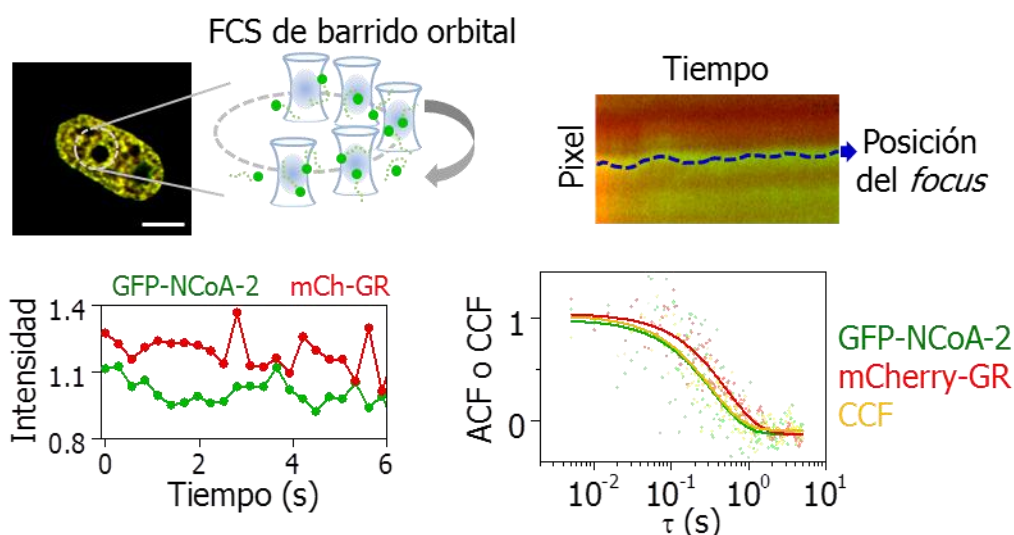


Figura 6.13. Esquema de la metodología empleada en los experimentos de FCS de barrido orbital sobre *foci*. Se realizaron barridos repetidos con el láser formando órbitas a través de *foci* de GR/NCoA-2. Luego se construyó una matriz de intensidad de fluorescencia y se determinó la trayectoria temporal del *focus* mediante seguimiento de partícula única. Se obtuvieron las trazas temporales de intensidad del *focus* y se calcularon entonces las funciones de autocorrelación (ACF) y correlación cruzada (CCF).

El tiempo de muestreo fue relativamente lento (5.1 ms). Como se describirá en el siguiente capítulo, al considerar la movilidad típica del receptor y el coactivador en el nucleoplasma (Figura 6.14), se observa un tiempo característico de difusión de 1-3 ms, en una escala temporal más rápida que el tiempo de muestreo. Por este motivo, no es posible observar eventos de difusión libre en las funciones de correlación adquiridas en los experimentos de barrido orbital, sino que sólo se aprecian eventos con dinámica más lenta. Por lo tanto, se

decidió utilizar un modelo que considera la unión a sitios fijos para ajustar a los datos de las funciones de correlación (Ecuación 5.10).

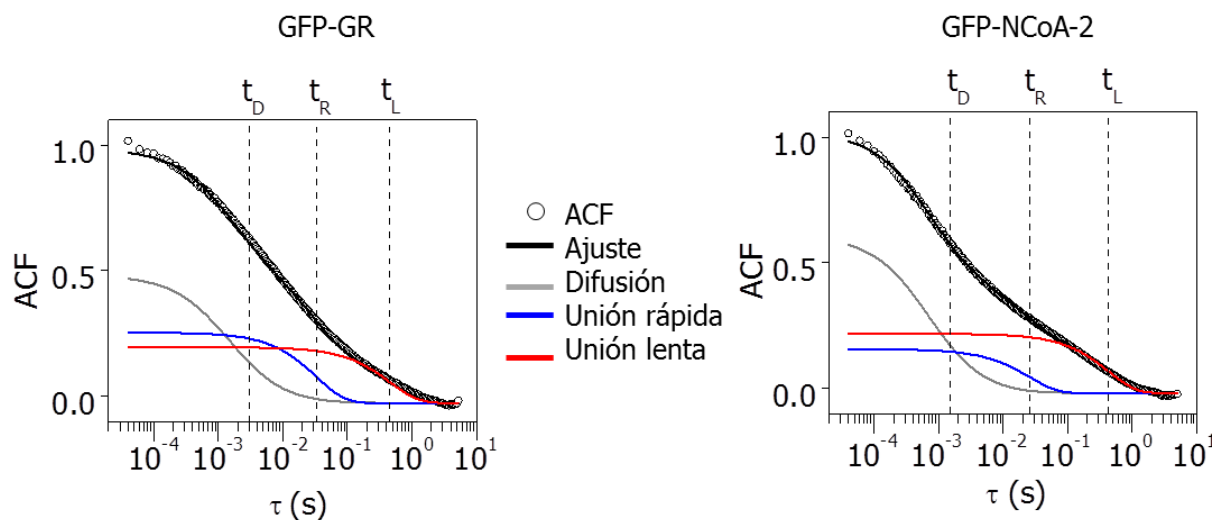


Figura 6.14. Movilidad de GR y NCoA-2 en el núcleo. Células BHK se transfectaron con GFP-GR o GFP-NCoA-2 y se tomaron medidas de FCS de punto único en el núcleo. Los datos de ACF se ajustan por un modelo que considera una población difusiva y dos poblaciones que se unen a distintos tipos de sitios: lentos y rápidos (Ecuación 5.8). Se muestran los tiempos característicos de difusión o de residencia para cada componente.

Para examinar la dinámica de GR y NCoA-2 en los *foci* en distintas condiciones, se realizaron experimentos de FCS de barrido en células BHK que expresaban GFP-NCoA-2 (tratadas con vehículo), GFP-GR (estimuladas con Dex) o que coexpresaban GFP-NCoA-2 y mCherry-GR y fueron tratadas con Dex. En la Figura 6.15 se muestran los tiempos de residencia obtenidos en cada condición, a partir de los ajustes de un modelo de asociación-disociación (Ecuación 5.10).

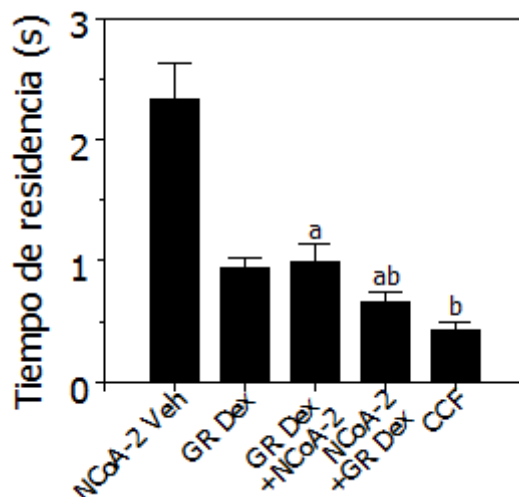


Figura 6.15. Dinámica de GR y NCoA-2 sobre los *foci*. Células BHK que expresaban sólo GFP-NCoA-2, sólo GFP-GR o que coexpresaban GFP-NCoA-2 y mCherry-GR fueron tratadas con Veh o Dex. Se estudió el intercambio de moléculas de GR y/o NCoA-2 en los *foci* a partir de experimentos de FCS de barrido orbital. Se calcularon las ACF y la CCF, según correspondiera, y se ajustó un modelo de una población de unión/despegado (Ecuación 5.10). Se muestra el tiempo de residencia promedio de las moléculas analizadas en las distintas condiciones en los *foci*. Las barras con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las ACF y la CCF en la condición GR+NCoA-2+Dex.

Se obtuvo un tiempo de residencia de ~1 s de GR/Dex en los *foci*, indicando una dinámica de intercambio relativamente rápida entre los *foci* y el nucleoplasma (Figura 6.15). En cambio, el tiempo de residencia de NCoA-2 en los grandes dominios focales asociados a cuerpos PML fue mayor (2.4 s), demostrando nuevamente la distinta naturaleza de los dos tipos de estructuras analizados (Figura 6.15).

La coexpresión de NCoA-2 no modificó el tiempo de residencia de GR/Dex en los *foci* (Figura 6.15). La amplitud positiva de la CCF indica la existencia de interacciones entre el receptor y el coactivador en los *foci* (Figura 6.13). El complejo GR/NCoA-2 presentó sin embargo un tiempo promedio de residencia en los *foci* significativamente menor que el del GR (Figura 6.15).

En la sección siguiente, se presentan enfoques complementarios que se llevaron a cabo con el objetivo de profundizar en la interpretación de estos resultados y comprender los mecanismos involucrados en la interacción del receptor y el coactivador con los *foci*.

6.7. Simulaciones de experimentos de FCS

La interpretación de los resultados obtenidos en experimentos de microscopía de fluorescencia, tales como el mostrado en la Figura 6.13, puede no ser simple ni intuitiva. En algunos casos, es complejo prever qué tipo de resultados esperar a partir de determinados escenarios posibles. En este sentido, el uso de simulaciones complementarias puede ayudar a interpretar resultados de experimentos complejos.

En la sección anterior, se obtuvieron parámetros cuantitativos que describen la dinámica de interacción de GR y NCoA-2 sobre los *foci*, en particular, el tiempo de residencia de estas biomoléculas en estas estructuras nucleares (Figura 6.15). Con el objetivo de analizar si estos resultados cuantitativos permiten obtener información acerca de los mecanismos que subyacen a la unión y a la liberación de estas proteínas en estas estructuras, se postularon distintos mecanismos moleculares para la interacción entre GR, NCoA-2 y los *foci*. Para cada escenario, se realizaron simulaciones de adquisición de datos de FCS de punto único con la plataforma MCell-FERNET [373]. Se simularon sistemas integrados por dos tipos de moléculas, a las cuales se denominarán *A* y *B* (*i.e.* GR y NCoA-2), que emiten fluorescencia en dos canales distintos y pueden interactuar entre sí y/o con sitios fijos. Es decir, estas moléculas pueden difundir libremente o estar inmovilizadas cuando se encuentran unidas a los sitios fijos. Los datos de FCS se analizaron de la misma manera que los obtenidos experimentalmente: se calcularon las ACF y la CCF correspondientes y, en los casos en que esto fue posible, se ajustó a los datos el modelo de Michelman-Ribeiro [290] que asume dos componentes: uno de difusión libre y otro de unión a sitios fijos (Ecuación 5.11).

La existencia de correlación cruzada positiva en los experimentos de FCS de GR y NCoA-2 sobre los *foci* (Figura 6.13) indica que la unión y/o la liberación de las moléculas reclutadas a estas estructuras no es al azar sino que ocurriría en un orden determinado, ya sea formando un complejo o de manera secuencial. Si tanto la unión como la liberación de GR y NCoA-2 en los *foci* fueran independientes entre sí, no existiría correlación cruzada [373]. Se consideraron entonces distintos escenarios en los que cabría esperar correlación cruzada positiva y se compararon cualitativamente los resultados obtenidos en las simulaciones con aquellos obtenidos en los ensayos de microscopía. A continuación se describen los escenarios simulados y los resultados obtenidos.

I) Complejo total

El escenario más simple es aquel en que A y B pueden formar un complejo AB que interactúa con el *focus* (Figura 6.16). Las moléculas A o B no son capaces de realizar esta interacción *per se*. En esta condición, las componentes de unión de las ACF y la CCF son idénticas, ya que en los sitios fijos A y B se comportan como una única molécula (Figura 6.16). Por lo tanto, los tiempos de residencia calculados a partir de las tres curvas no difieren entre sí.

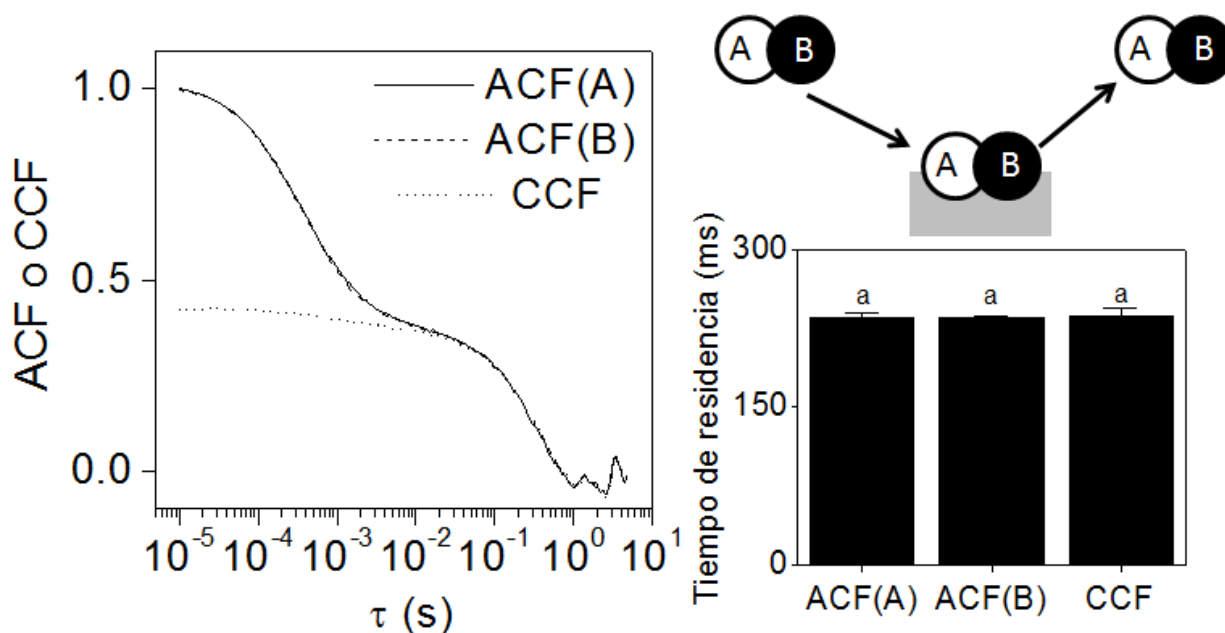


Figura 6.16. Simulaciones de experimentos de FCS en el sistema “complejo total” (I). Se consideró un sistema conteniendo moléculas A , B y AB en donde únicamente el complejo AB puede unirse y liberarse de sitios fijos. Se realizaron simulaciones de experimentos de FCS sobre este sistema y se calcularon las ACF y la CCF promedio. Se ajustó a los datos un modelo de difusión libre y un componente de unión a sitios fijos, obteniéndose los tiempos de residencia correspondientes (Ecuación 5.11). Las barras con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

II) Liberación aleatoria

Se consideró la posibilidad de que, como en el escenario anterior, sólo el complejo AB pudiera ingresar al sitio pero que la salida pudiera darse indistintamente como A , B o AB (Figura 6.17). En este caso, el tiempo de residencia del componente unido en las curvas de ACF y CCF depende del tiempo de residencia característico de cada especie. Dado que las

uniones de A , B y AB ocurren en un mismo evento, el tiempo de residencia calculado en cada canal depende únicamente de las k_{off} asignadas para cada uno.

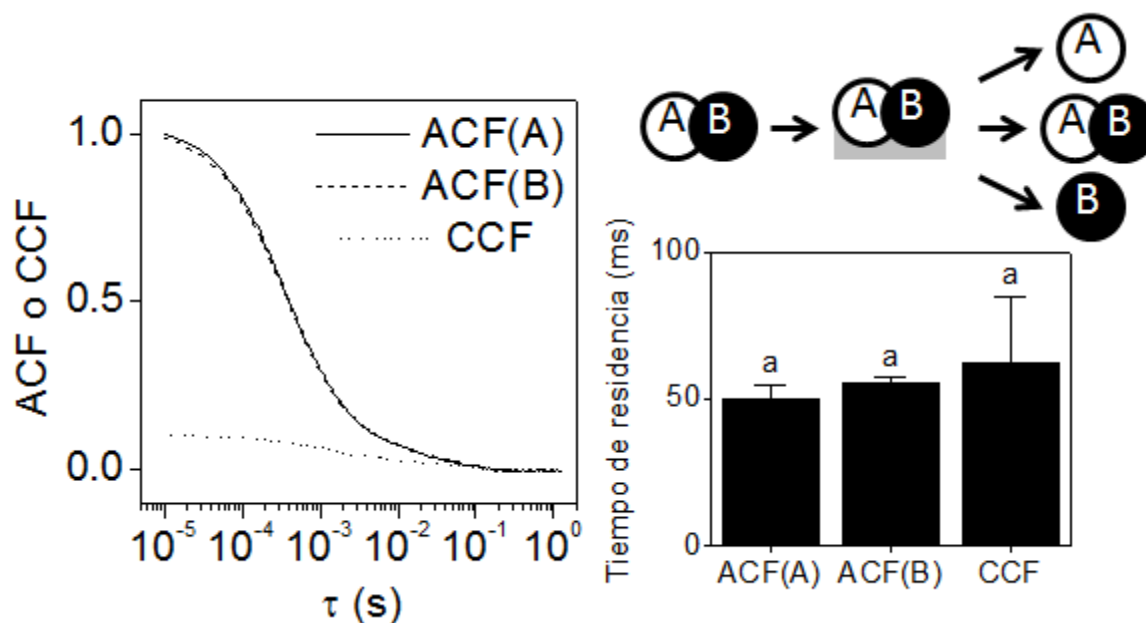


Figura 6.17. Simulaciones de experimentos de FCS en el sistema “liberación aleatoria” (II). Se consideró un sistema conteniendo moléculas A , B y AB en donde sólo AB puede unirse a sitios fijos, y la liberación de estos sitios puede darse como A , B o AB . Se realizaron simulaciones de experimentos de FCS y se calcularon las ACF y la CCF promedio. Se ajustó a los datos un modelo de difusión libre y un componente de unión a sitios fijos, obteniéndose los tiempos de residencia correspondientes (Ecuación 5.11). Las barras con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

III) Liberación secuencial

Por otra parte, cabe considerar la posibilidad de que la salida de las moléculas sea secuencial. Se simuló un sistema en el que el complejo AB se une al sitio, luego se libera la molécula B y finalmente la molécula A (Figura 6.18). En este escenario, el tiempo de residencia de la CCF es menor al de la ACF correspondiente a la molécula A (Figura 6.18), debido a que la correlación cruzada se mantiene de acuerdo a la permanencia de la molécula B , que se libera primero del sitio.

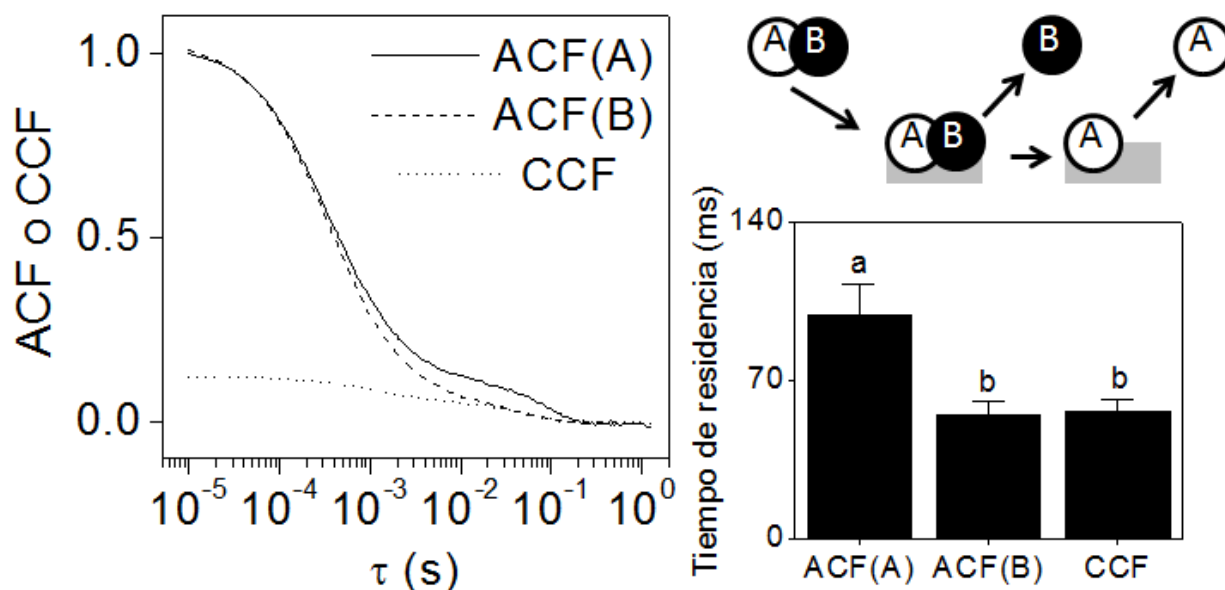


Figura 6.18. Simulaciones de experimentos de FCS en un sistema de “liberación secuencial” (III). Se consideró un sistema conteniendo moléculas A , B y AB en donde únicamente el complejo AB puede unirse a sitios fijos y luego se liberan secuencialmente B y A . Se realizaron simulaciones de experimentos de FCS sobre este sistema y se calcularon las ACF y la CCF promedio. Se ajustó a los datos un modelo de difusión libre y un componente de unión a sitios fijos, obteniéndose los tiempos de residencia correspondientes (Ecuación 5.11).

IV) Unión secuencial

En este escenario, se postuló que las moléculas A y B siguen un orden de unión para interactuar con el sitio fijo, como se propone por ejemplo para el ensamblado del complejo de preiniciación de la transcripción [84, 88]. En particular, la molécula A se une primero, luego la B y finalmente las moléculas se liberan conjuntamente, formando un complejo AB (Figura 6.19). En este escenario, la correlación cruzada se mantiene por un tiempo de retardo mayor que el de alguna de las ACF (Figura 6.19). Esto se debe a que la entrada de la primera molécula (A) correlaciona con la entrada de la segunda (B) pero como la primera debe esperar a la otra, la duración de la correlación cruzada es incluso mayor que el tiempo de residencia de la molécula que ingresa después.

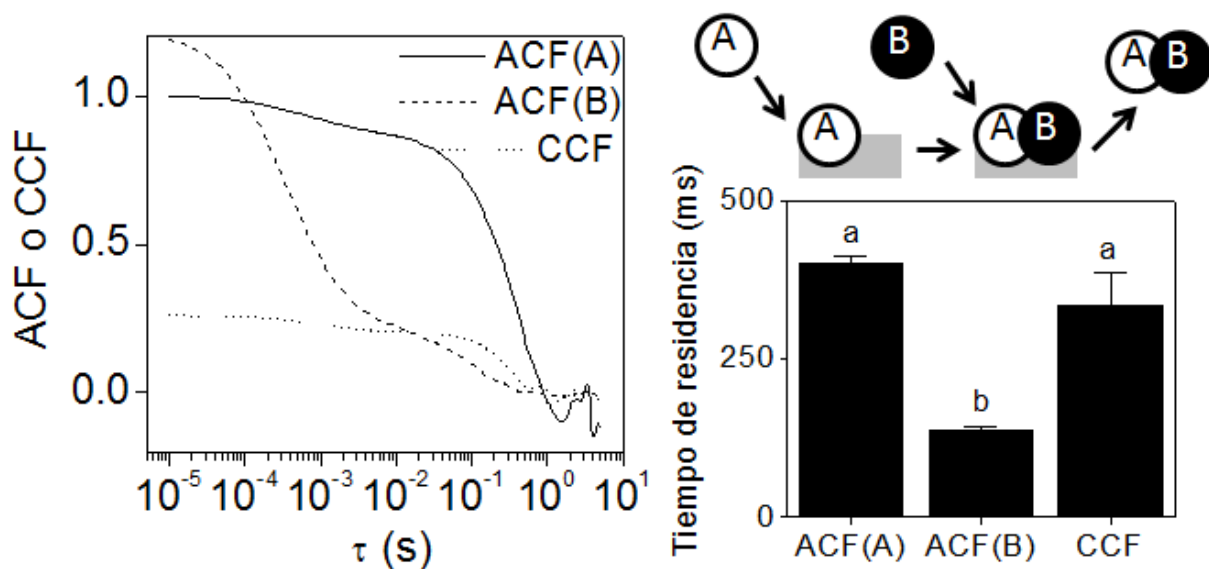


Figura 6.19. Simulaciones de experimentos de FCS en el sistema “unión secuencial” (IV). Se consideró un sistema conteniendo moléculas A , B y AB en donde A y B se unen secuencialmente a sitios fijos y luego se liberan como complejo AB . Se realizaron simulaciones de experimentos de FCS y se calcularon las ACF y la CCF promedio. Se ajustó a los datos un modelo de difusión libre y un componente de unión a sitios fijos, obteniéndose los tiempos de residencia correspondientes (Ecuación 5.11).

V) Secuencial total

En este escenario, tanto la unión como la liberación de A y de B siguen un determinado orden temporal (Figura 6.20). A se une al sitio antes que B y también se libera del sitio antes que B , una vez que está formado el complejo AB sobre el sitio. La forma de la curva de CCF es muy peculiar (Figura 6.20), dado que no es completamente decreciente sino que presenta un pico en un tiempo de retardo aproximado de 100 ms. Por esta razón, no se puede ajustar la ecuación 5.11 a los datos de CCF. Estos ejemplos ilustran la complejidad en la interpretación de datos de FCS.

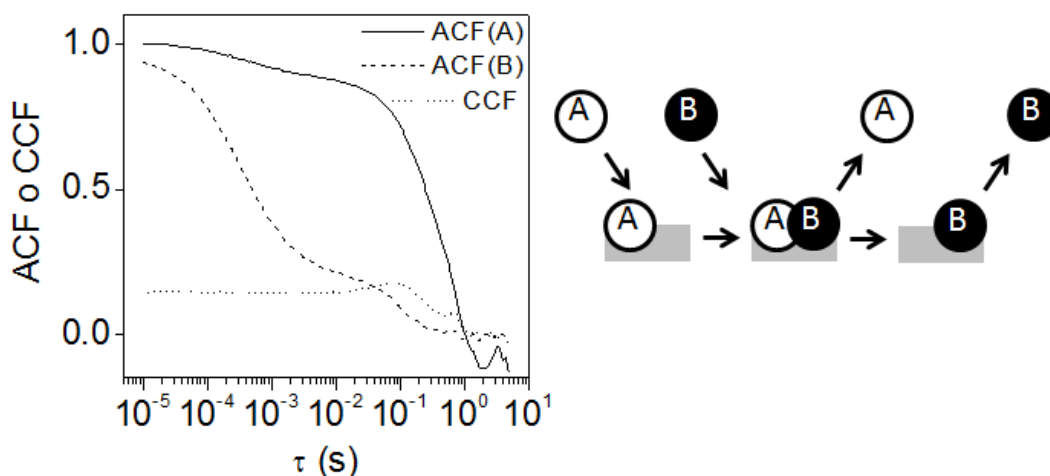


Figura 6.20. Simulaciones de experimentos de FCS en el sistema “secuencial total” (V). Se consideró un sistema conteniendo moléculas *A*, *B* y *AB* en donde *A* y *B* se unen secuencialmente a sitios fijos y luego se liberan secuencialmente en el mismo orden. Se realizaron simulaciones de experimentos de FCS y se calcularon las ACF y la CCF promedio.

Tal como se mencionó previamente, los resultados obtenidos a partir de las simulaciones pueden ser contrastados con los resultados de medidas de FCS en los *foci* con el fin de hallar mecanismos compatibles con las observaciones realizadas.

En imágenes de microscopía se observó que el mismo tipo de *foci* formados por GR y NCoA-2 parecería estar formado solamente por GR en ausencia del coactivador, pero no a la inversa (Figuras 6.1 y 6.5). Esta observación excluiría la posibilidad de que, estando GR y NCoA-2 unidos, pueda liberarse el receptor sin que se libere también el coactivador. Por otro lado, el tiempo de residencia de GR en los *foci* en ausencia de NCoA-2 no se modifica por la coexpresión del coactivador (Figura 6.15), por lo tanto cabría suponer que la k_{off} del complejo GR:NCoA-2 no es mayor que la del GR solo. Estas observaciones son incompatibles con las propiedades del modelo de “liberación aleatoria” (Figura 6.17).

En los *foci*, el tiempo de residencia calculado a partir de la CCF es menor que el del GR y no difiere del de NCoA-2. Este resultado puede ser explicado por un modelo de “liberación secuencial” (Figura 6.18). Esto implicaría que NCoA-2 se libera de los *foci* antes que el GR. Por otro lado, permite descartar un escenario de “complejo total” (Figura 6.16), en donde todos los tiempos de residencia son iguales entre sí, o un escenario tipo “unión secuencial” (Figura 6.19), en donde el tiempo de residencia del complejo es mayor que el de una de las moléculas. Tampoco es compatible un escenario “secuencial total” (Figura 6.20), en donde la curva de

CCF presenta un pico, ya que no se observó este comportamiento en las curvas de CCF obtenidas experimentalmente.

En definitiva, el conjunto de las observaciones experimentales, las medidas de FCS y las simulaciones sugiere que tanto GR como el complejo GR:NCoA-2 podrían unirse a los *foci*. No queda excluida la posibilidad de que moléculas de NCoA-2 puedan además asociarse a moléculas de GR ya unidas a *foci*. De acuerdo a nuestros resultados, la liberación sería secuencial: primero se libera NCoA-2 y luego GR. En la Figura 6.21 se representa entonces el modelo propuesto de unión y liberación de GR y NCoA-2 en los *foci*. Es preciso notar que el mecanismo de unión y liberación secuenciales, simulado por Angiolini y col. [373], sería un caso particular del modelo representado en la Figura 6.21.

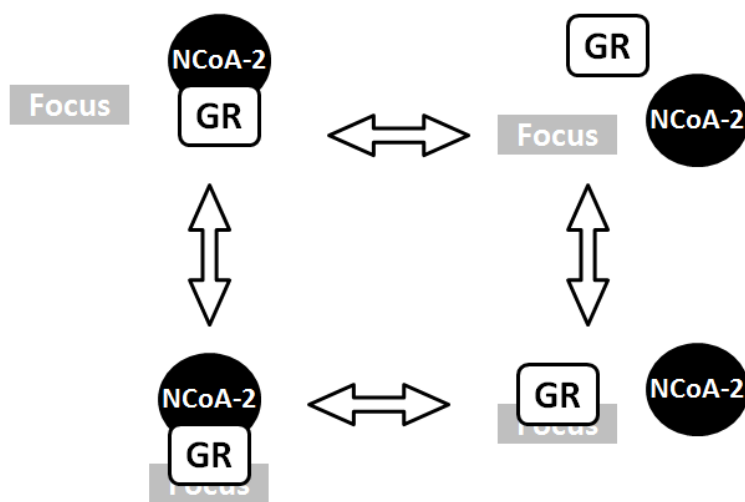


Figura 6.21. Modelo de interacción de GR y NCoA-2 con los *foci*. Las observaciones experimentales a partir de imágenes de microscopía confocal y mediciones de FCS en los *foci*, en conjunto con la realización de simulaciones de distintos escenarios, permitieron proponer el modelo representado para explicar las interacciones de GR y NCoA-2 con los *foci*.

6.8. Conclusiones parciales

En este capítulo se analizó la distribución espacial del GR dentro del núcleo, la relación entre esta distribución y la del coactivador NCoA-2, y cómo estos aspectos pueden ser afectados por el uso de ligandos y mutantes que presentan diferentes propiedades en su actividad transcripcional.

En ausencia de hormona, el GR se encuentra localizado principalmente en el citoplasma y su distribución nuclear es homogénea, mientras que el coactivador NCoA-2 se acumula en cuerpos nucleares PML. La activación del GR por unión del agonista Dex provoca su propia translocación al núcleo y la redistribución de ambas proteínas en *foci* subnucleares dependientes de ADN, en los que colocalizan. Esta redistribución del coactivador es reversible por remoción de la hormona y depende de la coexpresión del GR.

Estos fenómenos observados en la distribución espacial del GR y de NCoA-2 en el núcleo dependen de la conformación del receptor. GR unido al ligando disociado 21-OH o el mutante GR_{mon} unido a Dex presentan una densidad de *foci* subnucleares mucho menor que GR/Dex. A su vez, no son capaces de inducir la redistribución de NCoA-2 dependiente de hormona y de esta manera el coactivador permanece en los cuerpos PML. Estas propiedades podrían estar relacionadas con la incapacidad de estas conformaciones del receptor de inducir la transactivación génica. Por el contrario, el receptor mutante GR_{dim} presenta intacta su capacidad de formación de *foci* y de redistribución de NCoA-2 desde los cuerpos PML. Por lo tanto, su baja actividad transcripcional no puede ser explicada de acuerdo a su distribución espacial.

Los *foci* caracterizados en este capítulo presentan un intercambio dinámico de sus componentes GR y NCoA-2 con el nucleoplasma. Estas proteínas pueden formar heterocomplejos en los *foci*: la unión de NCoA-2 a estas estructuras requiere de GR pero el receptor puede unirse a los *foci* independientemente del coactivador. GR se liberaría de estas estructuras formando un complejo con NCoA-2 o secuencialmente después de la liberación del coactivador.

Resultados:

7. Dinámica temporal del GR

La función de los TF depende de su interacción con distintos componentes de la maquinaria transcripcional y con ciertas regiones cromatínicas. En el capítulo anterior, se mostró que existe un intercambio dinámico relativamente rápido entre el nucleoplasma y los *foci* de GR y su coactivador NCoA-2. En este capítulo, se exploró la movilidad del receptor y su coactivador en el núcleo y la interacción de estas moléculas con la cromatina y los sitios *blanco* en presencia de distintos ligandos del GR. Para complementar estas observaciones, se estudió también si ciertas mutaciones del GR afectan estas dinámicas.

7.1. Dinámica intranuclear de GFP

Como se verá en la sección 7.2, para estudiar la movilidad intranuclear del GR se realizaron experimentos de FCS de punto único en células BHK que expresaban transitoriamente GFP-GR.

Para verificar que las propiedades observadas en este tipo de experimentos se debieran únicamente a los efectos del receptor, primero se analizó la dinámica intranuclear de GFP. En una primera aproximación sería de esperar que esta pequeña proteína presente un comportamiento puramente difusivo; sin embargo, los datos de la ACF sugieren un comportamiento más complejo. En particular, se observó que estos datos podían ser explicados por un modelo que considera además una fracción unida a sitios fijos o por un modelo de difusión anómala (Figura 7.1).

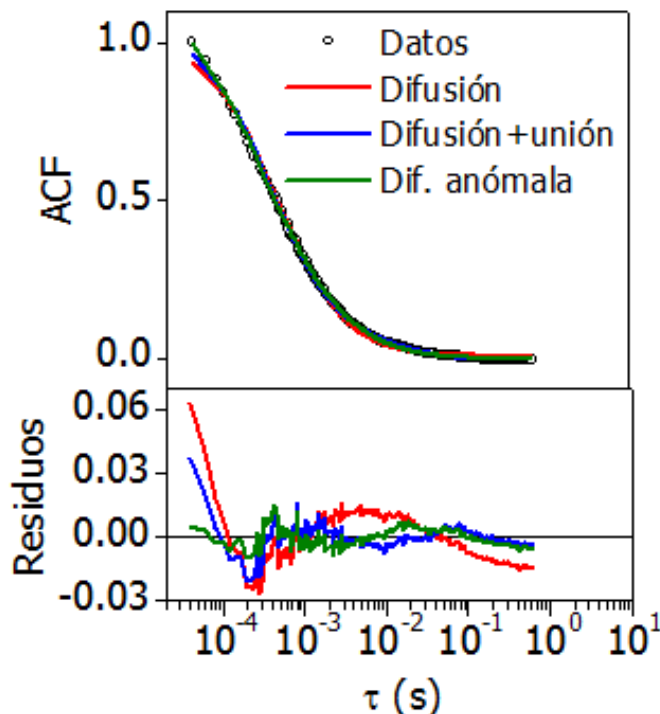


Figura 7.1. Dinámica intranuclear de GFP. La movilidad de GFP se analizó en el núcleo de células BHK por FCS de punto único. Se ajustaron modelos de difusión simple (Ecuación 5.12, línea roja), de un componente difusivo y otro componente de unión a sitios fijos (Ecuación 5.11, línea azul) o de difusión anómala (Ecuación 5.13, línea verde) a estos datos. Se muestran los residuos correspondientes a cada modelo de ajuste.

El modelo de unión a sitios fijos indica que (3.8 ± 1.0) % de las moléculas de GFP establecen interacciones con sitios inmóviles, con un tiempo de residencia de (57 ± 13) ms, mientras que el resto de la población difunde libremente con un coeficiente de difusión $D = (39 \pm 3) \mu\text{m}^2/\text{s}$. Este valor se encuentra dentro de lo esperado para GFP en el núcleo [391]. Por otra parte, la descripción de la dinámica de GFP de acuerdo a un modelo de difusión anómala arrojó un $D = (44 \pm 4) \mu\text{m}^2/\text{s}$, con un coeficiente de difusión anómala $\alpha = 0.83 \pm 0.02$ (cuando $\alpha = 1$ se trata de difusión normal). Este modelo podría tener otro significado biológico. Una explicación posible requiere considerar al núcleo como un ámbito poroso que presenta obstáculos o barreras a la difusión de moléculas inertes, de acuerdo a su tamaño [298, 304, 307]. Estos obstáculos pueden estar distribuidos al azar, de manera fractal o formando corrales [307]. También la existencia de interacciones rápidas podría originar una difusión anómala.

Independientemente del modelo que se utilice para ajustar los datos, la dinámica intranuclear de GFP muestra que esta proteína se comporta como una proteína relativamente inerte en el núcleo, y por lo tanto su uso como proteína fluorescente de fusión a GR es adecuado para estudiar la dinámica del receptor.

7.2. Dinámica intranuclear de GFP-GR

La fusión de GR a GFP mostró una importante reducción de la movilidad intranuclear respecto a la observada para GFP en células BHK (Figuras 7.1 y 7.2). El resultado es esperable dado que se trata de una proteína de mayor tamaño que además interactúa con la cromatina. La estimulación del receptor con Dex produjo una reducción en su movilidad aún mayor (Figura 7.2).

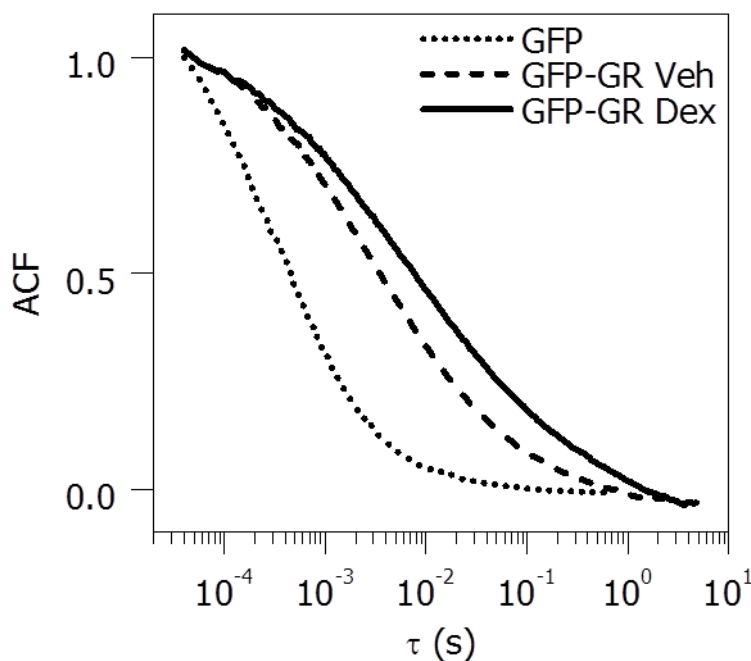


Figura 7.2. Dinámica intranuclear de GR. La movilidad de GFP-GR se analizó por FCS de punto único en el núcleo de células BHK que fueron tratadas con Veh o Dex. Se muestran las curvas promedio de ACF. A modo comparativo, también se muestra la ACF promedio correspondiente a GFP.

Tanto en su estado inactivo como activo, la forma de la ACF promedio de GFP-GR resultó muy distinta a la de GFP. Dada la posible interacción entre la cromatina y el GR activado, se ajustó a los datos experimentales un modelo que incluya la interacción del GR con sitios fijos [290]. La teoría detrás de este modelo se describe en la sección 3.3. Sin embargo, al igual que en otros estudios de dinámica de TF [377], los datos no pudieron ser explicados por un modelo con un único tipo de sitios de unión, sino que fue necesario considerar dos poblaciones de sitios con distinta dinámica de interacción con el GR, además de la fracción difusiva (Figura 7.3). La Ecuación 5.8 que describe este modelo y las aproximaciones realizadas para su derivación se detallan en la sección 5.11.5. Estos sitios fijos difieren en el tiempo de residencia promedio de las moléculas, y se definieron entonces como sitios lentos (del orden de 200–500 ms) o sitios rápidos (del orden de 20–60 ms).

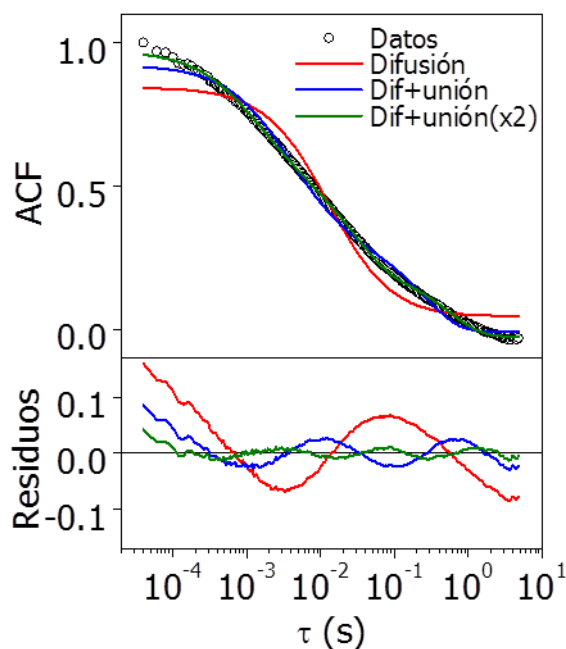


Figura 7.3. Análisis cuantitativo de la dinámica intranuclear de GR. La movilidad de GFP-GR se analizó en el núcleo de células BHK por FCS de punto único. Se ajustó a los datos un modelo de difusión simple (Ecuación 5.12) o un modelo que considerara además una (Ecuación 5.11) o dos poblaciones de sitios fijos con distinta afinidad por el receptor (Ecuación 5.8). Se muestran los residuos correspondientes a cada modelo de ajuste.

De esta manera, el ajuste del modelo representado por la ecuación 5.8 a los datos experimentales permitió un análisis cuantitativo de la dinámica del GR y sus interacciones con la cromatina. En particular, se pudo obtener información acerca de la fracción poblacional involucrada en difusión libre con su respectivo coeficiente difusional y las fracciones poblacionales involucradas en la unión a los sitios rápidos y lentos, con sus respectivos tiempos de residencia.

La reducción de la movilidad intranuclear del GR inducida por la estimulación con Dex pudo ser traducida en términos cuantitativos mediante el análisis de estos parámetros (Figura 7.4). La activación hormonal del receptor aumentó significativamente tanto la fracción unida como el tiempo de residencia en los sitios lentos, que suponen una unión relativamente más específica del TF con la cromatina. Por otra parte, la estimulación también produjo un aumento del tiempo de residencia en los sitios rápidos (Figura 7.4).

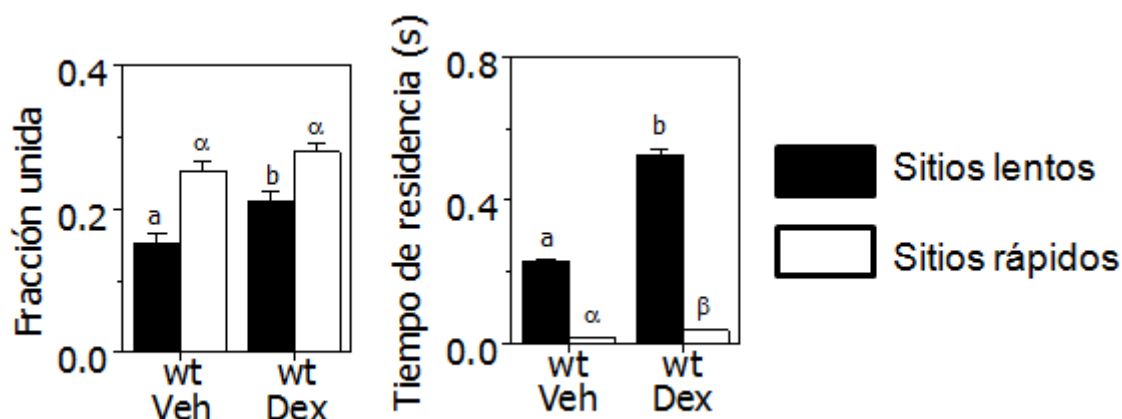


Figura 7.4. Parámetros cuantitativos de la dinámica intranuclear de GR. La movilidad de GFP-GR se analizó en el núcleo de células BHK tratadas con Veh o Dex por FCS de punto único. Los datos se ajustan por un modelo de difusión y dos poblaciones de unión a sitios lentos y rápidos (Ecuación 5.8). Se representan la fracción unida y el tiempo de residencia en cada tipo de sitio. Las barras con distintas letras y misma fuente son significativamente diferentes ($p < 0.05$). No se compararon entre sí los datos que presentan distinta fuente.

7.3. Influencia de la conformación del GR en su dinámica intranuclear

A continuación se exploró la dinámica intranuclear presentada por distintas variantes conformacionales del GR con diferentes respuestas transcripcionales, mediante el uso de mutantes u otros ligandos del receptor. La estimulación con 21-OH (sección 2.8.2), sorpresivamente presentó una reducción de la movilidad del GR similar a la producida por el agonista completo Dex (Figura 7.5). Tanto las fracciones unidas a ambos tipos de sitios como el tiempo de residencia en los sitios lentos fueron similares para GR/21-OH y GR/Dex, aunque el tiempo de residencia en los sitios rápidos de GR/21-OH resultó algo menor que el de GR/Dex (Figura 7.5).

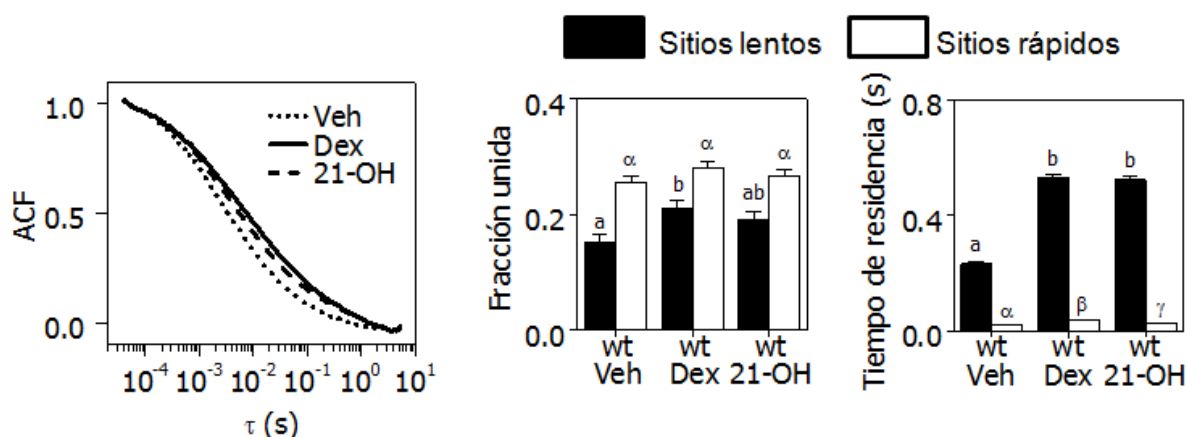


Figura 7.5. Dinámica intranuclear de GR/21-OH. La movilidad de GFP-GR se analizó en el núcleo de células BHK tratadas con 21-OH por FCS de punto único. Se ajustó a los datos un modelo de difusión y dos poblaciones de unión a sitios lentos y rápidos (Ecuación 5.8). Se representan la ACF promedio, la fracción unida y el tiempo de residencia en cada tipo de sitio. A modo comparativo, se incluyen además los datos de GR/Veh y GR/Dex mostrados en las Figuras 7.2 y 7.4. Las barras con distintas letras y misma fuente son significativamente diferentes ($p < 0.05$). No se compararon entre sí los datos que presentan distinta fuente.

La dinámica del mutante GRdim en células estimuladas con Dex (Figura 7.6) también resultó sorpresivamente muy similar a la del receptor salvaje, pese a su incapacidad de inducir la expresión génica [169] (sección 2.8). Al analizar los parámetros obtenidos del ajuste de la Ecuación 5.8 a los datos, se observó una reducción en el tiempo de residencia de GRdim/Dex en los sitios lentos y rápidos respecto a los obtenidos para GR salvaje (Figura 7.6).

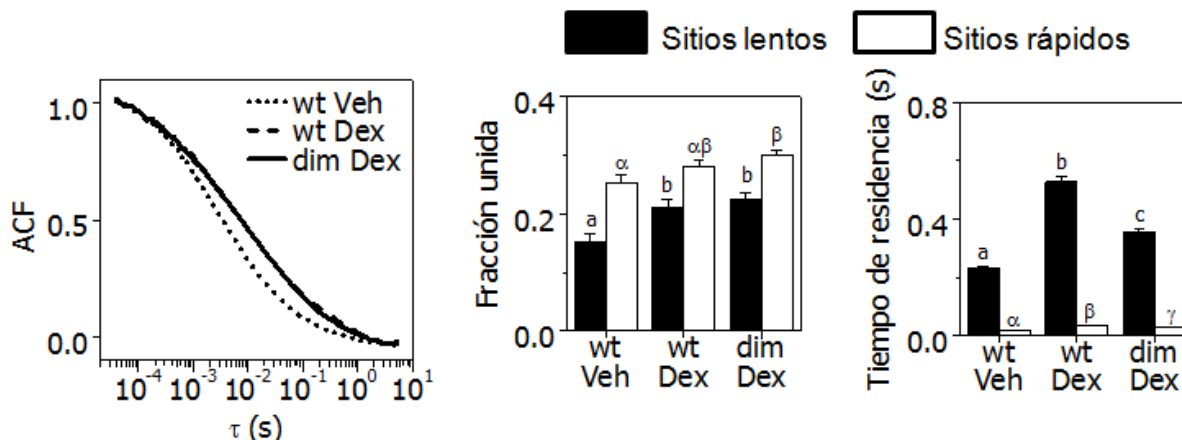


Figura 7.6. Dinámica intranuclear de GRdim/Dex. La movilidad de GFP-GRdim se analizó en el núcleo de células BHK tratadas con Dex por FCS de punto único. Se ajustó a los datos un modelo de difusión y dos poblaciones de unión a sitios lentos y rápidos (Ecuación 5.8). Se representan la ACF promedio, la fracción unida y el tiempo de residencia en cada tipo de sitio. A modo comparativo, se incluyen además los datos de GR/Veh y GR/Dex mostrados en las Figuras 7.2 y 7.4. Las barras con distintas letras y misma fuente son significativamente diferentes ($p < 0.05$). No se compararon entre sí los datos que presentan distinta fuente.

En contraste a lo observado para las conformaciones del GR estudiadas previamente, el comportamiento del mutante GRmon resultó muy diferente. La dinámica de GRmon en células estimuladas con Dex fue similar a la observada para el receptor salvaje en ausencia de ligando (Figura 7.7), sugiriendo que la incapacidad de esta variante de activar la transcripción [169] es consecuencia de interacciones menos eficientes con la cromatina. Este mutante presentó una marcada reducción de la fracción unida a los sitios lentos y del tiempo de residencia en estos sitios, respecto del salvaje (Figura 7.7).

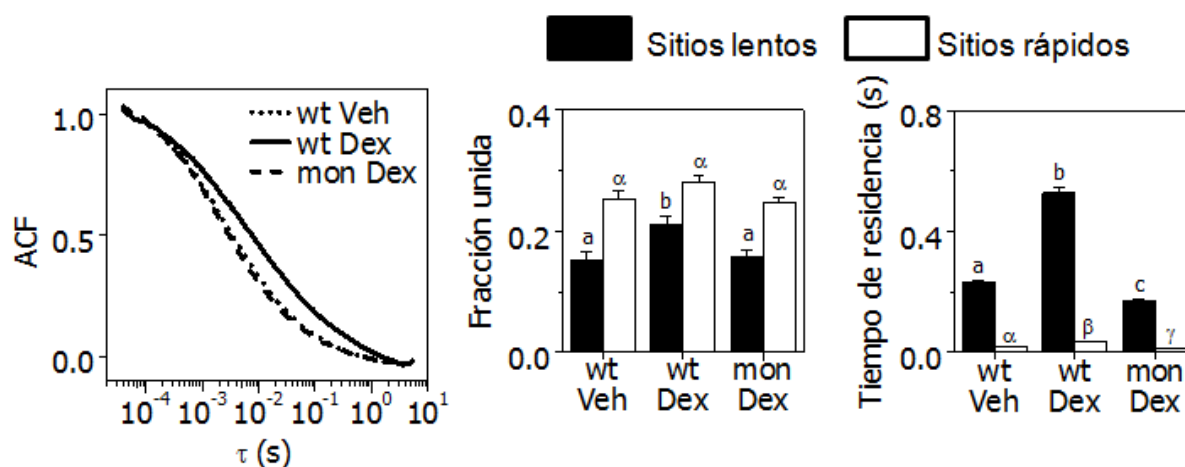


Figura 7.7. Dinámica intranuclear de GRmon/Dex. La movilidad de GFP-GRmon se analizó en el núcleo de células BHK tratadas con Dex por FCS de punto único. Se ajustó a los datos un modelo de difusión y dos poblaciones de unión a sitios lentos y rápidos (Ecuación 5.8). Se representan la ACF promedio, la fracción unida y el tiempo de residencia en cada tipo de sitio. A modo comparativo, se incluyen además los datos de GR/Veh y GR/Dex mostrados en las Figuras 7.2 y 7.4. Las barras con distintas letras y misma fuente son significativamente diferentes ($p < 0.05$). No se compararon entre sí los datos que presentan distinta fuente.

Por otra parte, la dinámica intranuclear de GRdim en células sin estimular mostró una leve pero significativa reducción del tiempo de residencia en los sitios lentos (Figura 7.8). Sin embargo, la movilidad de GRmon en células sin estimular fue mayor que la del GR salvaje: presentó fracciones unidas menores y tiempos de residencia menores, en ambos tipos de sitios (Figura 7.8). Por lo tanto, los defectos de este mutante en la interacción con la cromatina se hacen evidentes también en condiciones basales, es decir, en ausencia de hormona.

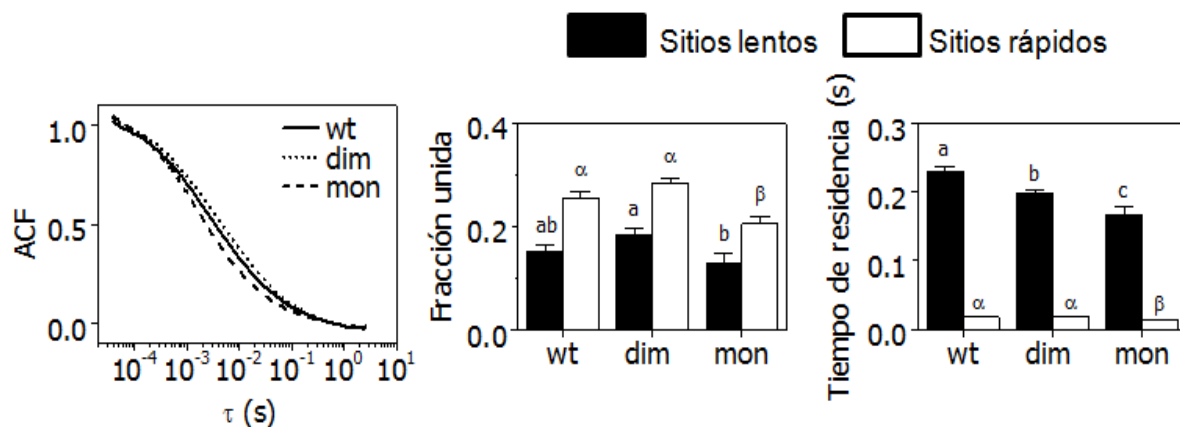


Figura 7.8. Dinámica intranuclear de GRdim y GRmon en células sin estimular. La movilidad de GFP-GRdim y GFP-GRmon se analizó en el núcleo de células BHK tratadas con Veh por FCS de punto único. Se ajustó a los datos un modelo de difusión y dos poblaciones de unión a sitios lentos y rápidos (Ecuación 5.8). Se representan la ACF promedio, la fracción unida y el tiempo de residencia en cada tipo de sitio. A modo comparativo, se incluyen además los datos de GR/Veh mostrados en las Figuras 7.2 y 7.4. Las barras con distintas letras y misma fuente son significativamente diferentes ($p < 0.05$). No se compararon entre sí los datos que presentan distinta fuente.

7.4. Efectos de la sobreexpresión de NCoA-2 sobre la dinámica intranuclear del GR

Con el objetivo de explorar si el coactivador NCoA-2 modula las interacciones del GR con la cromatina, se investigó el efecto de la coexpresión de mCherry-NCoA-2 en la dinámica intranuclear de distintas variantes conformacionales del GR. Para ello, se realizaron experimentos de FCS de punto único en células cotransfectadas con GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon y mCherry-NCoA-2, tratadas o sin tratar con Dex ó 21-OH (Figura 7.9).

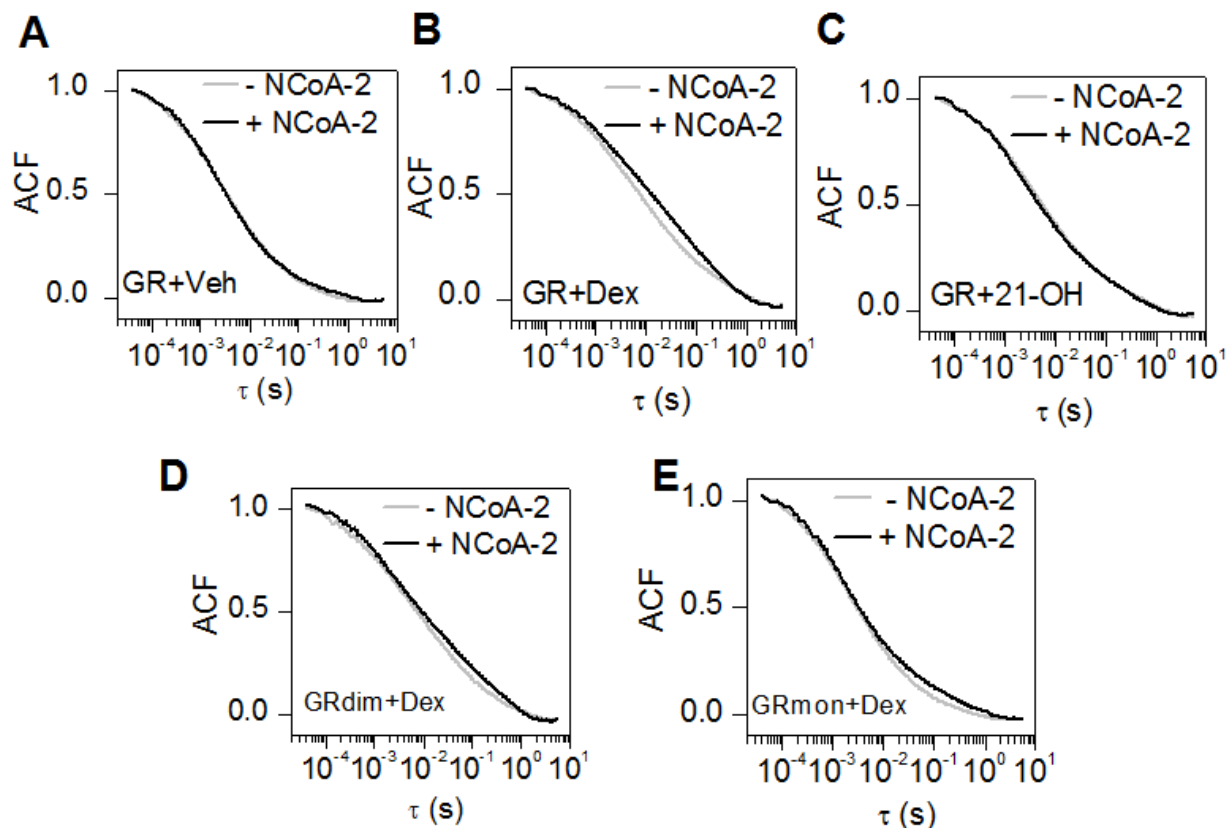


Figura 7.9. Influencia de la expresión de NCoA-2 en la dinámica intranuclear de GR. La movilidad de GFP-GR (A-C), GFP-GRdim (D) o GFP-GRmon (E) se analizó en células BHK tratadas con Veh (A), Dex (B, D, E) ó 21-OH (C) y cotransfectadas (línea negra) o no (línea gris) con mCherry-NCoA-2 por FCS de punto único en el núcleo. Se muestran las curvas ACF promedio obtenidas en cada condición.

La Figura 7.9 muestra que la dinámica del GR sin ligando no se modificó con la sobreexpresión de NCoA-2, mientras que en células estimuladas con Dex la sobreexpresión del coactivador produjo una reducción en la movilidad intranuclear del receptor. En esta condición, la coexpresión del coactivador aumentó considerablemente la fracción del GR unida a los sitios lentos (Figura 7.10). Este resultado es compatible con la interacción entre ambas proteínas inducida por Dex, descrita en la literatura [392].

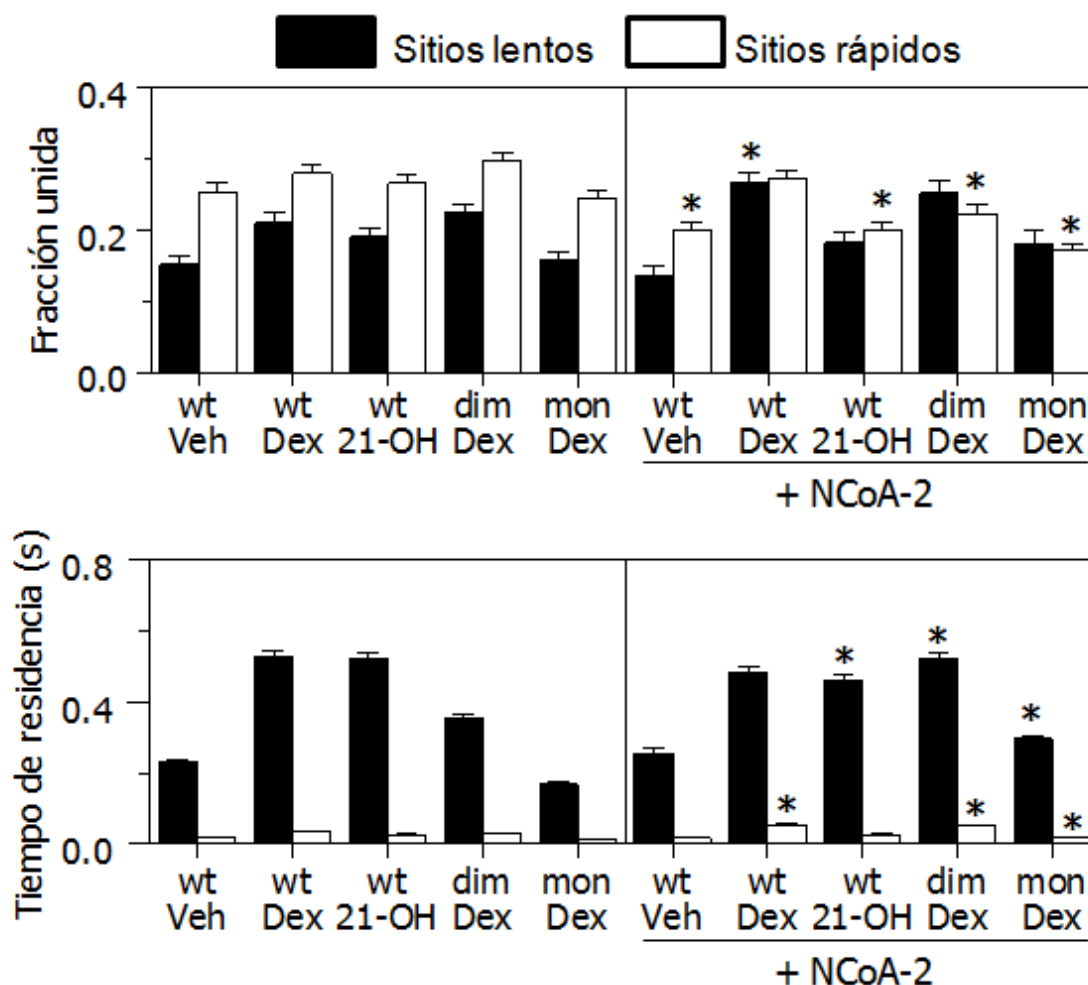


Figura 7.10. Influencia de la expresión de NCoA-2 en la dinámica intranuclear de GR. La movilidad de GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon se analizó en células BHK tratadas con Veh, Dex o 21-OH y cotransfectadas o no con mCherry-NCoA-2 por FCS de punto único en el núcleo. Se ajustó a los datos un modelo de difusión y dos poblaciones de unión a sitios lentos y rápidos (Ecuación 5.8). Se representan la fracción unida y el tiempo de residencia en cada tipo de sitio. Los asteriscos sobre las barras indican que la sobreexpresión de NCoA-2 modifica significativamente la fracción unida o el tiempo de residencia del GR respecto de las células no cotransfectadas con el coactivador ($p < 0.05$).

Por otra parte, la sobreexpresión de NCoA-2 no produjo efectos considerables en el comportamiento dinámico de GR en células estimuladas con 21-OH (Figuras 7.9 y 7.10). Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos previamente en nuestro laboratorio [387], mostrando que este ligando desfavorece la interacción entre el receptor y su coactivador.

Por último, la coexpresión de NCoA-2 introdujo pequeños cambios en las curvas promedio de ACF correspondientes a los mutantes GRdim y GRmon estimulados con Dex

(Figura 7.9). Esto se vio reflejado en un aumento de los tiempos de residencia de los mutantes en los sitios lentos y rápidos respecto a los observados en ausencia del coactivador (Figura 7.10).

Notoriamente, la sobreexpresión de NCoA-2 no produjo cambios significativos en la fracción unida a los sitios lentos de GR/21-OH, GRdim/Dex, GRmon/Dex y GR sin ligando pero resultó en una disminución de la fracción unida a los sitios rápidos (Figura 7.10). Este resultado no fue observado para GR/Dex, para la cual la sobreexpresión del coactivador tuvo como consecuencia un aumento en la fracción unida a sitios lentos, manteniéndose constante la fracción unida a sitios rápidos (Figura 7.10).

7.5. Dinámica intranuclear de NCoA-2

La dinámica del coactivador fusionado a GFP también fue estudiada por experimentos de FCS de punto único, siguiendo los procedimientos descritos previamente para el receptor.

La Figura 7.11A muestra la ACF promedio correspondiente a GFP-NCoA-2 en células cotransfectadas con mCherry-GR y tratadas con Dex. A estos datos se ajustaron también modelos sencillos utilizados para el caso del GR (Figura 7.3) y se pudo verificar que, al igual que en el caso del receptor, los datos de FCS de NCoA-2 en el núcleo deben ser explicados por el modelo que considera la interacción del coactivador con dos poblaciones de sitios diferentes (Figura 7.11A). Este resultado era esperable ya que, al igual que los TF, los correguladores de la transcripción también interactúan directa o indirectamente con la cromatina. No se analizaron los datos de FCS de mCherry-NCoA-2, generados en los experimentos descritos en la sección anterior, ya que las curvas de ACF obtenidas para la variante del coactivador fusionado a mCherry presentaron un ruido mucho mayor que aquellas obtenidas para GFP-NCoA-2.

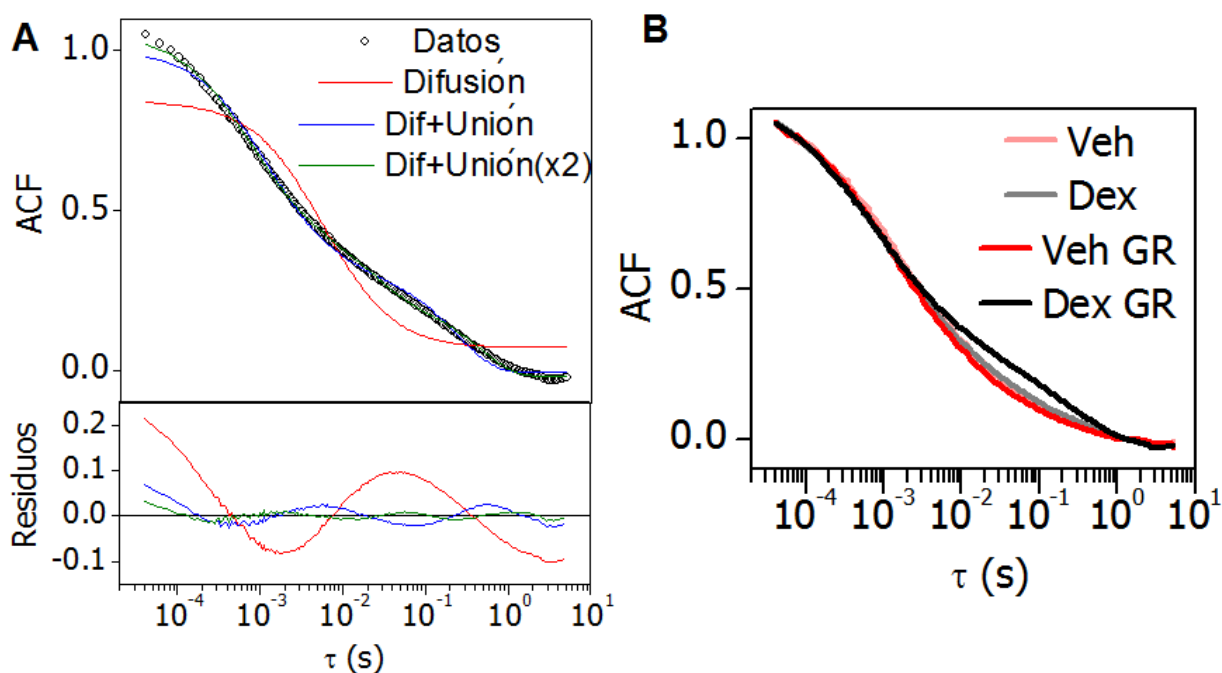


Figura 7.11. Dinámica intranuclear de NCoA-2. La movilidad de GFP-NCoA-2 se analizó en el núcleo de células BHK por FCS de punto único. **(A)** Se ajustó a los datos un modelo de difusión simple (Ecuación 5.12) o un modelo que considerara además una (Ecuación 5.11) o dos poblaciones involucradas en la unión a sitios fijos (Ecuación 5.8). Se muestran los residuos correspondientes a cada modelo de ajuste. **(B)** Movilidad intranuclear de GFP-NCoA-2 en células BHK cotransfectadas o no con mCherry-GR, y tratadas con Veh o Dex. Se representan las ACF promedio.

De manera análoga a como se hizo en la sección anterior, se evaluó cómo la sobreexpresión de mCherry-GR influye en la dinámica intranuclear de GFP-NCoA-2, tanto en células control como en células estimuladas. En la Figura 7.11B se muestran las curvas de ACF promedio obtenidas en las distintas condiciones y en la Figura 7.12 se representan los parámetros determinados a partir del ajuste de la Ecuación 5.8 a estos datos.

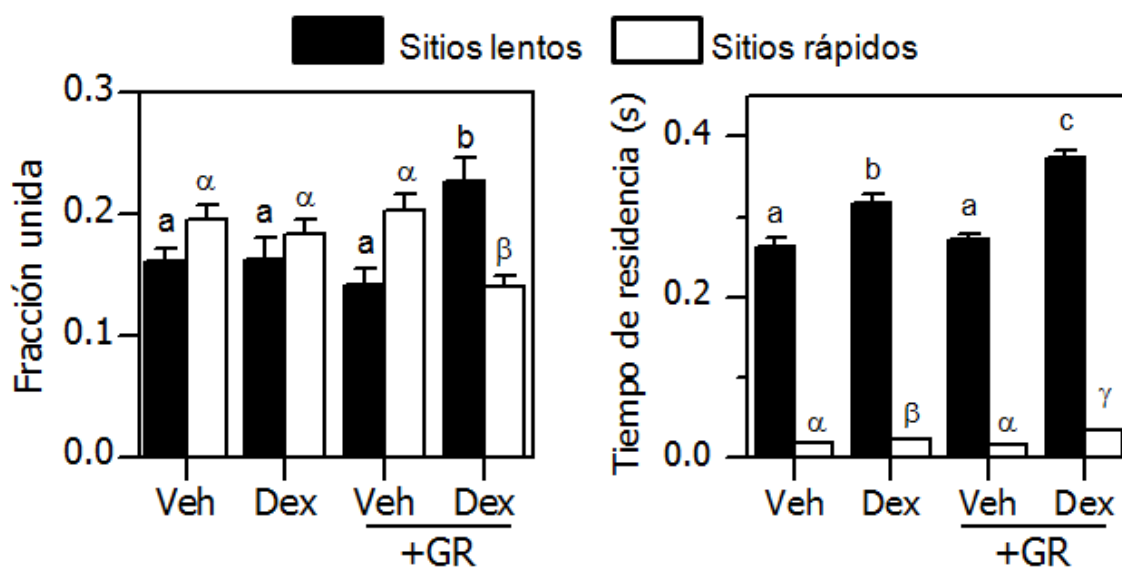


Figura 7.12. Influencia de la activación del GR sobre la dinámica intranuclear de NCoA-2. La movilidad de GFP-NCoA-2 se analizó en células BHK control o cotransfectadas con mCherry-GR y tratadas con Veh o Dex por FCS de punto único en el núcleo. Se ajustó a los datos un modelo de difusión y dos poblaciones de unión a sitios lentos y rápidos (Ecuación 5.8). Se representan la fracción unida y el tiempo de residencia en cada tipo de sitio. Las barras con distintas letras y misma fuente son significativamente diferentes ($p < 0.05$). No se compararon entre sí los datos que presentan distinta fuente.

La Figura 7.11 muestra que la movilidad de NCoA-2 en el núcleo fue muy similar en presencia y en ausencia de Dex en células BHK que sólo expresan el coactivador fusionado a GFP. En estas condiciones, la estimulación con Dex apenas produjo un leve aumento de los tiempos de residencia del coactivador (Figura 7.12). Estos resultados sugieren que Dex no produce grandes modificaciones en la distribución del coactivador y que la activación del receptor endógeno no es suficiente para provocar la redistribución del cofactor entre las diferentes poblaciones de sitios de unión.

La sobreexpresión de GR tampoco provocó *per se* un cambio en la movilidad de NCoA-2 (Figuras 7.11 y 7.12). Sin embargo, la activación del receptor por unión de Dex en condiciones de sobreexpresión de GR sí introdujo una reducción drástica en la movilidad del coactivador (Figuras 7.11 y 7.12). Este cambio se manifiesta en un aumento considerable de los tiempos de residencia y de la fracción unida a los sitios lentos a expensas de la fracción unida a los sitios rápidos (Figura 7.12). Es decir, la estimulación del receptor induce la redistribución del coactivador que migra de los sitios rápidos a los lentos.

7.6. Formación de complejos GR/NCoA-2 en el núcleo

Los experimentos de FCS en dos colores permiten calcular, además de las ACF, la CCF, que describe la dinámica de los complejos formados por las proteínas fusionadas a cada uno de los dos fluoróforos [288]. Este método se denomina espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS) y sus fundamentos se explican en las secciones 5.11.1, 5.11.3 y 5.11.4.

A partir de los experimentos de FCS de punto único en células BHK que coexpresaban GFP-GR y mCherry-NCoA-2, pudieron calcularse las ACF correspondientes a cada una de las dos proteínas y la CCF que provee información acerca de posibles interacciones entre GR y NCoA-2 (Figura 7.13A). Los experimentos de correlación cruzada se hicieron también para las distintas conformaciones del GR analizadas previamente. Como control, se hizo este mismo tipo de ensayo en células BHK que coexpresaban GFP-GR y mCherry y fueron tratadas con Dex (Figura 7.13B). La amplitud prácticamente nula de la CCF indica que estas proteínas no interactúan entre sí.

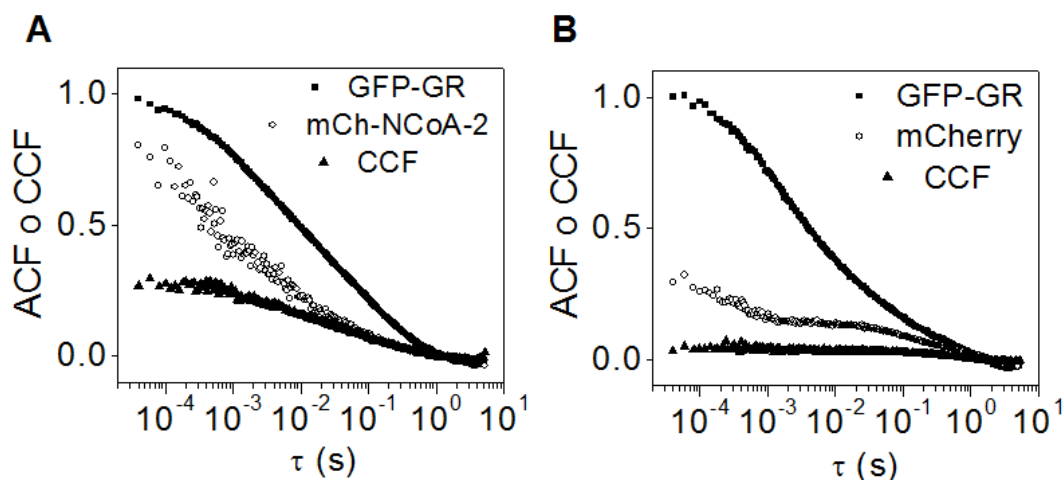


Figura 7.13. Formación de complejos GR/NCoA-2 en el núcleo. Se tomaron medidas de FCS de punto único en el núcleo de células BHK que fueron transfectadas con GFP-GR y mCherry-NCoA-2 (**A**) o mCherry (**B**) y tratadas con Dex. Se calcularon las ACF promedio correspondientes a GFP-GR (cuadrados negros) y mCherry-NCoA-2 o mCherry (círculos blancos), y la CCF promedio (triángulos negros) calculada a partir de ambas trazas temporales de intensidad de fluorescencia. Los cálculos de las funciones de correlación se describen en la sección 5.11.3.

La amplitud positiva de la CCF observada en células que coexpresan GFP-GR y mCherry-NCoA-2 muestra la presencia de interacciones entre el receptor y el coactivador en el núcleo de células vivas (Figura 7.13). Lamentablemente, y tal como se mencionó previamente, las curvas de ACF obtenidas para mCherry-NCoA-2 y, en consecuencia, las curvas de CCF presentaron ruido apreciable por lo cual no fue posible ajustar la Ecuación 5.8 a estos datos. Un ajuste de este modelo a los datos de CCF hubiera permitido analizar la distribución de los complejos GR/NCoA-2 en las distintas poblaciones de sitios de unión y su dinámica sobre estos sitios.

Para cuantificar las interacciones, se decidió utilizar un enfoque alternativo. Si bien no es posible analizar el comportamiento de cada componente, las amplitudes de las curvas de ACF y CCF brindan información sobre la abundancia local de cada proteína y de los complejos (sección 5.11.3). Para minimizar el efecto del ruido de cada medición individual, se promediaron los primeros 5 datos de cada curva para calcular la amplitud. A partir de estos datos, se obtuvieron las concentraciones de GR, NCoA-2 y los complejos GR/NCoA-2 y se utilizaron estos valores para calcular una constante de asociación aparente (K_a) entre ambas proteínas (Figura 7.14), tal como se indica en la sección 5.11.4. Es importante destacar que este análisis asume una estequiometría entre ambos componentes del complejo de 1:1.

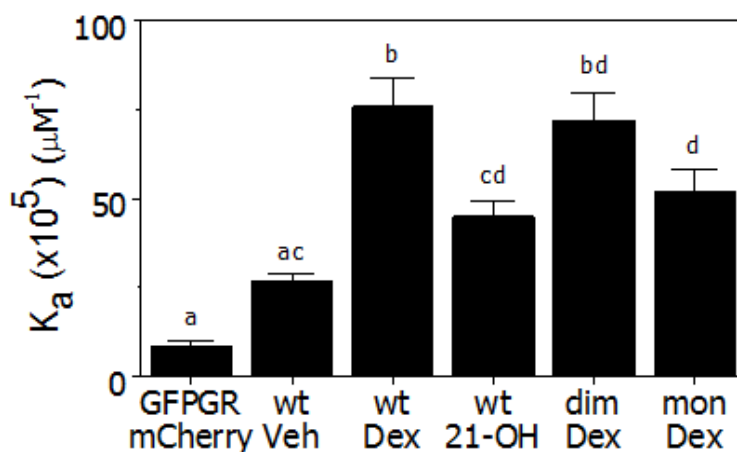


Figura 7.14. Formación de complejos GR/NCoA-2 en el núcleo. Se tomaron medidas de FCS de punto único en el núcleo de células BHK transfectadas con GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon y mCherry-NCoA-2 y tratadas con Veh, Dex ó 21-OH. Se calcularon las ACF promedio correspondientes a GFP-GR (línea continua) y mCherry-NCoA-2 (línea de guiones), y la CCF promedio (línea punteada) calculada a partir de ambas trazas temporales de intensidad de fluorescencia (sección 5.11.3). Se calculó una constante de disociación (K_a) en cada una de las condiciones a partir de las amplitudes de las ACF y CCF (sección 5.11.4). Las barras con distintas letras difieren significativamente entre sí ($p < 0.05$).

Se realizó este experimento en las distintas condiciones experimentales estudiadas en la sección anterior pudiendo así obtener información cuantitativa acerca de la interacción entre GR y NCoA-2 en el nucleoplasma de células vivas.

En concordancia con la bibliografía [392], la estimulación con Dex indujo una mayor asociación entre GR y NCoA-2. Por otra parte, el tratamiento con el ligando disociado 21-OH no favoreció la unión del receptor a su coactivador (Figura 7.14), tal como se observó en nuestro laboratorio por ensayos de co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en extractos celulares [387]. El mutante GRdim presentó un nivel de interacción con el coactivador similar al receptor salvaje. Por el contrario, el mutante GRmon presentó una capacidad reducida de interactuar con el coactivador (Figura 7.14). Este comportamiento de los mutantes de GR es consistente con su capacidad de inducir o no la redistribución subnuclear de NCoA-2 (Figura 6.6).

7.7. Interacción entre GR y una región enriquecida en elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE)

Los experimentos de FCS de punto único en posiciones aleatorias dentro del núcleo permiten capturar interacciones entre TF y la cromatina de menor o mayor especificidad. Sin embargo, no es posible saber si involucran a las interacciones con secuencias de unión específicas del TF presentes en el ADN. Es esperable que estos sitios específicos sean poblacionalmente minoritarios respecto de los sitios inespecíficos.

Con el objetivo de estudiar de qué manera las condiciones exploradas anteriormente influyen en las interacciones entre GR y sus secuencias *blanco* en un sistema en que este tipo de interacciones fueran mayoritarias, se utilizó la línea celular 3617, que presenta en su genoma la inserción de un arreglo de aproximadamente 200 copias del promotor del virus de tumor mamario murino (MMTV). Cada copia contiene a su vez 5 GRE (Figura 7.15) [393, 394].

Cuando estas células expresan GFP-GR, la estimulación con Dex induce el reclutamiento del receptor fluorescente a este arreglo, y éste se visualiza por microscopía como una pequeña región de mayor intensidad (Figura 7.15) [334]. La posibilidad de visualizar una región discreta del núcleo con una alta concentración de sitios de unión específicos resulta muy atractiva para explorar la dinámica de interacción del GR y otros componentes de la maquinaria transcripcional con estos sitios *blanco*. Los ensayos realizados con esta herramienta

experimental fueron llevados a cabo por Dr. Diego Presman, en el laboratorio del Dr. Gordon Hager en el NIH, Estados Unidos. El análisis de los datos fue realizado como parte del trabajo de esta Tesis.

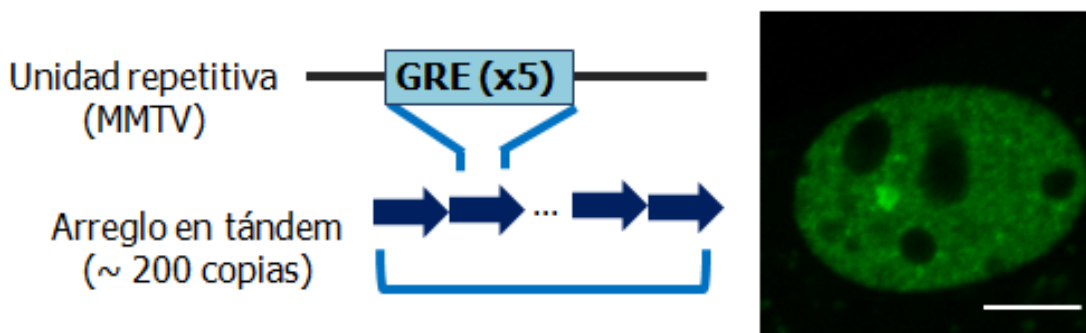


Figura 7.15. Esquema del arreglo de MMTV. La línea celular 3617 presenta en su genoma un arreglo en tándem de alrededor de 200 copias del promotor MMTV, que está constituido por 5 GRE. Se muestra una célula representativa expresando GFP-GR y tratada con Dex (escala: 5 µm). La región brillante se debe a la acumulación del receptor activado sobre el arreglo.

7.7.1. Reclutamiento de GR al arreglo MMTV

Como punto de partida, se exploró cuantitativamente el reclutamiento al arreglo MMTV del receptor salvaje y los mutantes en presencia de los ligandos utilizados en las secciones anteriores. Para ello, se contabilizó el número de células que presentaban un arreglo visible, siguiendo para ello la metodología descrita en la sección 5.8.

Se utilizó este criterio y no otros como por ejemplo evaluar la intensidad o el área de la región correspondiente al arreglo MMTV, ya que en trabajos previos se demostró que existe una gran variabilidad intercelular en cuanto al tamaño, la forma y la intensidad de fluorescencia del arreglo [395]. Como consecuencia, se asumió en este trabajo de Tesis que, si bien existirían procesos celulares no definidos que introducen variabilidad en las características del arreglo MMTV, una mayor probabilidad de reclutamiento a los GRE debería reflejarse en una mayor proporción de células con arreglo visible.

La Figura 7.16 muestra que un 55% de las células 3617 presentaron reclutamiento visible del GR al arreglo de MMTV cuando fueron estimuladas con Dex. En cambio, sólo un 10% de las células analizadas presentaron un arreglo visible luego del tratamiento con 21-OH.

Por otra parte, el mutante GRmon presentó un reclutamiento menor que el GR salvaje. Estos resultados concuerdan con deficiente actividad de GR/21-OH y GRmon/Dex como inductores de la expresión del reportero luciferasa bajo el control del promotor MMTV [169, 270]. Sin embargo, resulta sorprendente que el reclutamiento de GRdim haya sido similar al del GR salvaje (Figura 7.16), considerando que este mutante también tiene afectada su capacidad de inducir la transactivación del promotor MMTV [169]. Este resultado sugiere que la deficiencia transcripcional de GRdim no se debe principalmente a una incapacidad de unirse a los GRE.

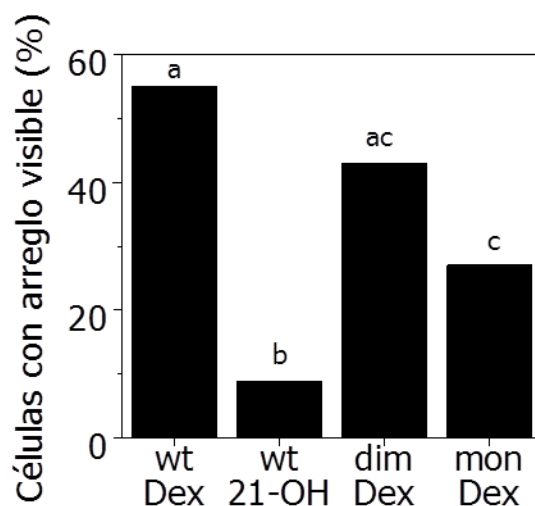


Figura 7.16. Reclutamiento de GR al arreglo de MMTV. Células 3617 transfectadas con GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon se trataron con Dex o 21-OH. Se cuantificó el porcentaje de células que presentaban un arreglo visible a partir de imágenes de campos tomados al azar y barridos en z (sección 5.8). Barras con distintas letras indican diferencias significativas entre sí, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Marascuilo (sección 5.13) [379].

7.7.2. Dinámica de la interacción de GR con el arreglo MMTV

Con el fin de estudiar la dinámica de interacción del GR con el arreglo MMTV, se realizaron experimentos similares a los utilizados para estudiar la dinámica de GR en los *foci* subnucleares (sección 6.6). Se realizaron medidas de FCS de barrido lineal sobre el arreglo MMTV en células 3617 que expresaban GFP-GR y fueron tratadas con Dex. Se obtuvo una matriz de intensidad en función de la posición y el tiempo (Figura 7.17) y se analizó esta matriz

con un algoritmo de seguimiento de partícula única para compensar por posibles movimientos del arreglo MMTV a lo largo de la medición. A partir de esta matriz, se obtuvo la traza temporal de intensidad de fluorescencia de GFP-GR en la región del arreglo y se calculó la ACF correspondiente (Figura 7.17).

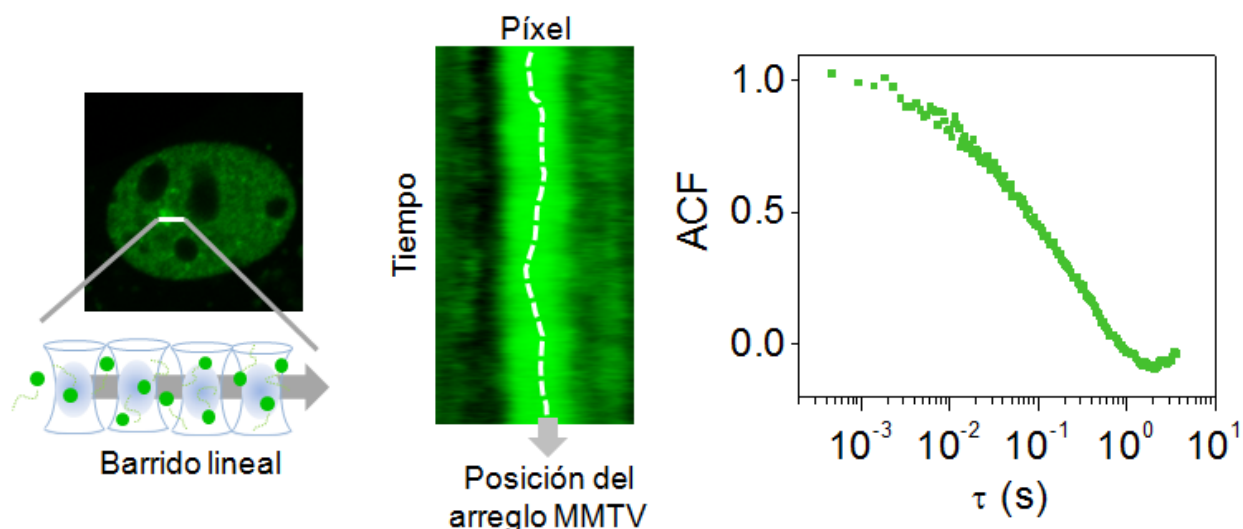


Figura 7.17. Dinámica de GR en el arreglo de MMTV. Células 3617 se transfectaron con GFP-GR y se trataron con Dex. Para analizar la dinámica de GR en el arreglo MMTV se realizaron medidas de FCS de barrido lineal. Se hizo barrer el láser en líneas repetidamente sobre el arreglo MMTV. Luego se recuperó la matriz de intensidad de fluorescencia en función del tiempo y la posición de la línea para recuperar la posición del arreglo con un algoritmo de seguimiento de partícula única. A partir de estos datos, se calculó la ACF de GFP-GR en el arreglo.

En estos experimentos de FCS de barrido lineal, el tiempo de muestreo fue lento como para poder detectar eventos de difusión libre. En consecuencia, se intentó ajustar la Ecuación 5.10, que describe un modelo de interacción con una única población de sitios fijos pero este modelo no se pudo ajustar a los datos (Figura 7.18). Se incluyó una segunda población de sitios en el modelo y se ajustó la Ecuación 5.9 a los datos (Figura 7.18). Es decir, el modelo de unión a sitios rápidos y sitios lentos resultó un ajuste adecuado a los datos de FCS de GR en el arreglo MMTV. Este modelo tiene sentido asumiendo que el volumen de observación confocal no solamente incluye al arreglo de GRE, sino también a otras regiones de la cromatina, en donde el GR puede unirse de forma menos específica.

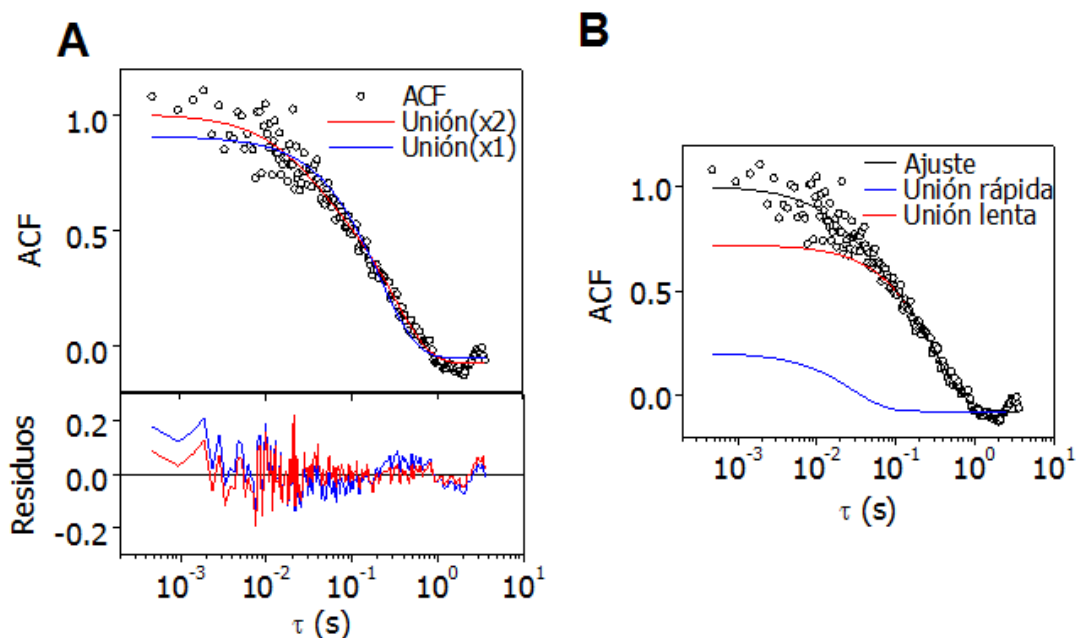


Figura 7.18. Análisis de la dinámica de GR en el arreglo de MMTV. Células 3617 se transfectaron con GFP-GR y fueron tratadas con Dex. Se estudió la dinámica de GR en el arreglo MMTV por mediciones de FCS de barrido lineal. **(A)** Se ajustaron modelos que consideran interacciones con una (Ecuación 5.10) o dos poblaciones de sitios fijos (Ecuación 5.9). Se muestran también los residuos de los respectivos ajustes. **(B)** Componentes de unión rápida y lento según un ajuste de un modelo de dos poblaciones de sitios.

La Figura 7.19 muestra los resultados obtenidos en células 3617 expresando GFP-GR y estimuladas con Dex, comparados con los obtenidos en las mismas condiciones las mediciones de FCS de punto único en posiciones al azar en el núcleo de células BHK (sección 7.2). Es importante destacar que, al no ser posible observar la fracción difusiva por la baja resolución temporal de estos experimentos, la fracción que interactúa con los sitios lentos se expresa de manera relativa al total de las dos fracciones unidas.

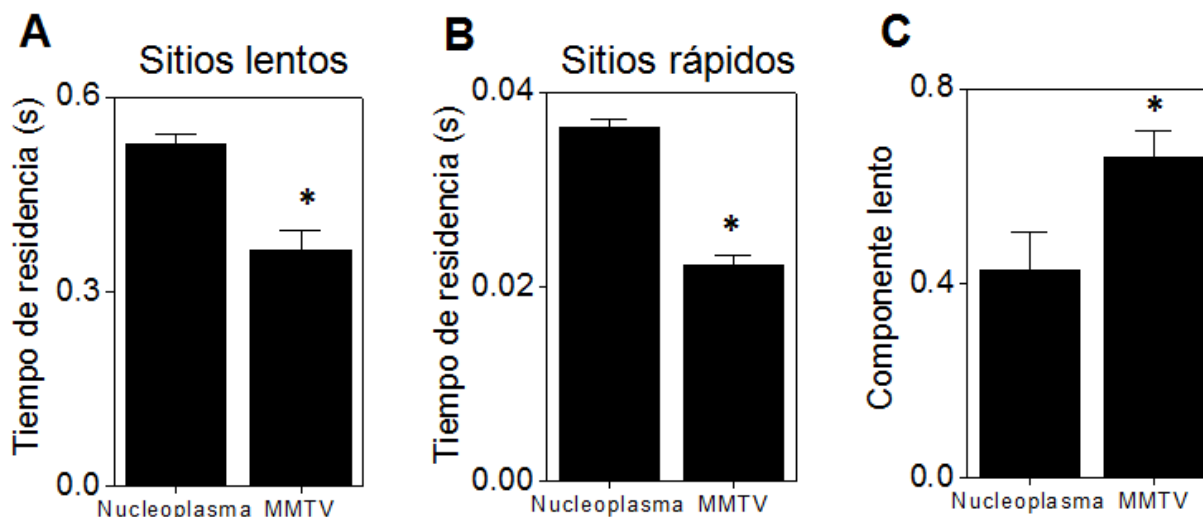


Figura 7.19. Parámetros de la dinámica de GR en el arreglo MMTV y en el nucleoplasma. Las células 3617 se transfectaron con GFP-GR y se trataron con Dex. Se estudió la dinámica de GR en el arreglo MMTV por mediciones de FCS de barrido lineal. Se ajustó a estos datos un modelo de dos poblaciones uniéndose a sitios lentos y rápidos (Ecuación 5.9). Se representan los tiempos de residencia de cada componente (**A y B**) y la fracción relativa del componente lento respecto de la suma de los componentes lento y rápido (**C**). A modo comparativo, se representan los parámetros de ajuste de un modelo de difusión y dos componentes de unión (Ecuación 5.8) a los datos de FCS de punto único obtenidos en el nucleoplasma de células BHK expresando GFP-GR y tratadas con Dex. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las medidas obtenidas en el nucleoplasma y en el arreglo MMTV ($p < 0.05$).

Los tiempos de residencia del GR en ambos tipos de sitios (lentos y rápidos) obtenidos a partir de experimentos en el arreglo MMTV fueron significativamente menores que los determinados en el nucleoplasma por ensayos de punto único (Figura 7.19A-B). De hecho, Morisaki y col. [361] hallaron por SMT interacciones algo más rápidas en el arreglo MMTV que en dominios de transcripción activa en el núcleo. De todos modos, los tiempos de residencia obtenidos se encuentran en el mismo orden de magnitud que los medidos en el nucleoplasma.

Por otra parte, en el arreglo se detectó una mayor fracción del componente lento respecto de lo observado en el nucleoplasma (Figura 7.19C). Este resultado es lógico considerando que en el volumen de observación que incluye al arreglo de MMTV existe una mayor densidad de sitios de unión específicos que los que se pueden incluir en el resto de las regiones del genoma.

7.7.3. Dinámica de la interacción de GR y NCoA-2 con el arreglo MMTV

Para estudiar la interacción de GR y NCoA-2 con el arreglo MMTV, se realizaron experimentos de FCS de barrido lineal como los descritos en la sección anterior, en células 3617 que coexpresaban GFP-GR y mCherry-NCoA-2. La Figura 7.20A muestra que el coactivador fusionado a mCherry, al igual que el receptor, se acumula en el arreglo MMTV formando una región más brillante en células 3617 estimuladas con Dex.

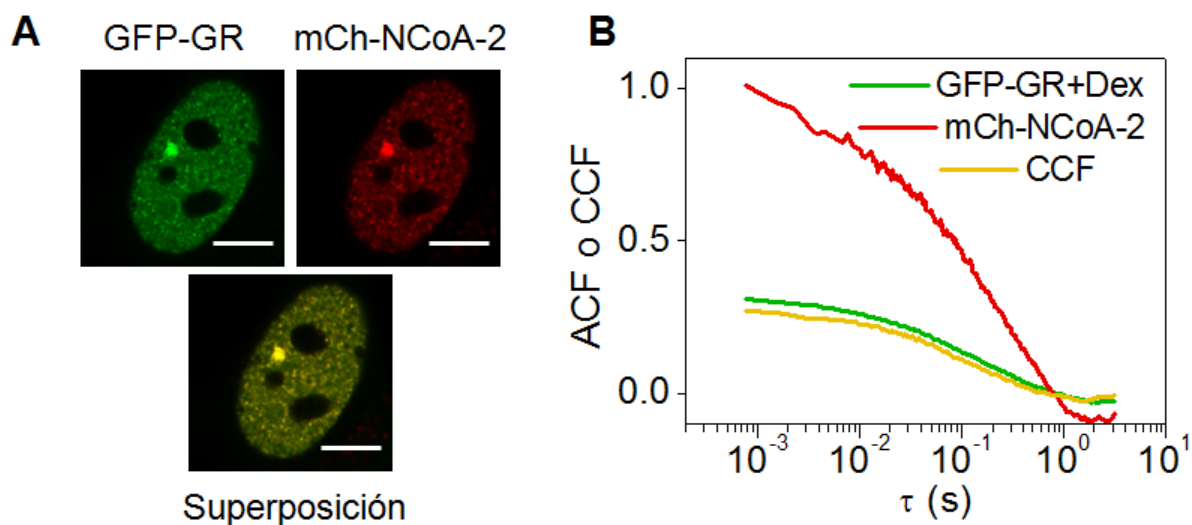


Figura 7.20. Dinámica de GR y NCoA-2 en el arreglo de MMTV. Células 3617 se transfectaron con GFP-GR y mCherry-NCoA-2 y se trataron con Dex. **(A)** Imágenes representativas de una célula. **(B)** Se realizaron medidas de FCS de barrido lineal y se calcularon las ACF y la CCF en la región comprendida por el arreglo.

De manera similar a lo realizado en la sección 6.6, para estudiar la dinámica del receptor y el coactivador por FCS de barrido se utilizó la matriz de intensidad en función del tiempo y la posición correspondiente a GFP-GR para seguir la posición del arreglo, y se calcularon las ACF de GFP-GR y mCherry-NCoA-2 y la CCF en la región comprendida por el arreglo MMTV (Figura 7.20B). La amplitud positiva de esta CCF indica que GR y NCoA-2 interactúan en este arreglo de GRE en el ADN.

Este tipo de experimentos se realizó en células 3617 que coexpresaban GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon y mCherry-NCoA-2 y que fueron tratadas con Dex o 21-OH. Se ajustó a

los datos de ACF y CCF un modelo de dos fracciones unidas a distintos tipos de sitios (Ecuación 5.9). La Figura 7.21 muestra los parámetros determinados a partir de este ajuste, para las diferentes condiciones estudiadas.

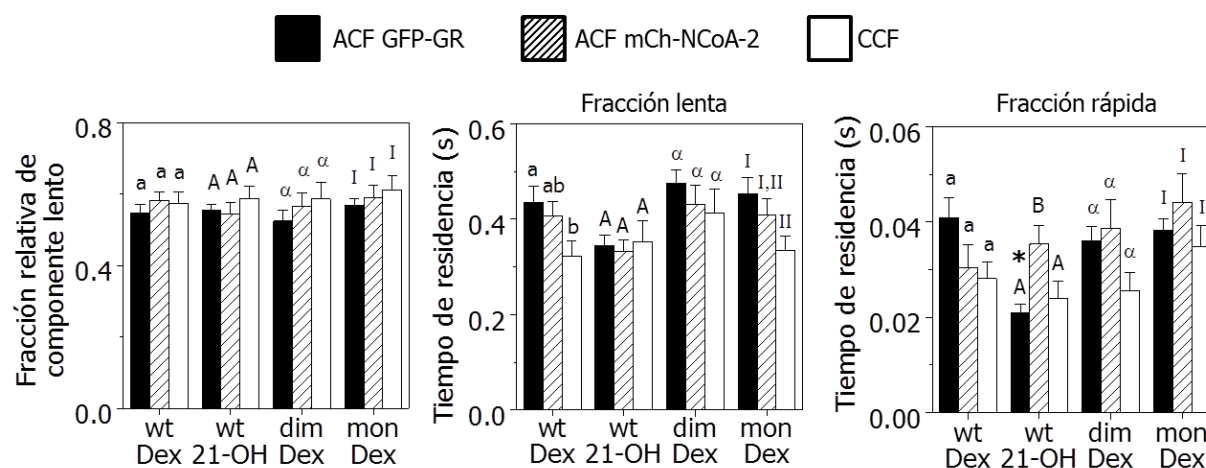


Figura 7.21. Parámetros de la dinámica de GR y NCoA-2 en el arreglo MMTV. Las células 3617 se transfectaron con mCherry-NCoA-2 y GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon, y se trataron con Dex o 21-OH. Se estudió la dinámica de GR y NCoA-2 en el arreglo MMTV por mediciones de FCS de barrido lineal. Se ajustó el modelo de dos poblaciones de sitios (Ecuación 5.9) a los datos de ACF y CCF. Se representan la fracción relativa del componente lento respecto de la suma de los componentes lento y rápido, y los tiempos de residencia de cada componente. Las barras con distintas letras y misma fuente indican diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$) para comparaciones entre las ACF y CCF de una misma condición. El asterisco indica diferencias significativas con los datos obtenidos en células que expresaban GFP-GR y mCherry-NCoA-2 y fueron tratadas con Dex.

Sorpresivamente, la dinámica de intercambio de GR y NCoA-2 entre el arreglo MMTV y el nucleoplasma no presentó diferencias entre las distintas condiciones estudiadas, pese a que tanto los mutantes GRdim y GRmon estimulados con Dex como el receptor salvaje en presencia del ligando 21-OH son incapaces de transactivar un gen reportero bajo el control de MMTV [169]. La fracción relativa unida a los sitios lentos fue la misma para todas las condiciones (Figura 7.21) y los tiempos de residencia fueron muy similares, aunque el tiempo de residencia de GR/21-OH en los sitios rápidos resultó ligeramente menor (Figura 7.21).

De manera similar a lo observado para la dinámica de GR y NCoA-2 sobre los *foci* subnucleares (Figura 6.15), el tiempo de residencia de GR/Dex en los sitios lentos fue

significativamente mayor al observado para la CCF (Figura 7.19). Dado que los resultados obtenidos en los foci y en el arreglo MMTV son similares, se podría postular una dinámica de interacciones de GR y NCoA-2 con los sitios GRE del arreglo según el modelo representado en la Figura 6.21. Por lo tanto, existiría algún tipo de secuencialidad en los eventos de unión y salida del receptor y el coactivador en el arreglo de MMTV.

7.8. Efecto del coactivador NCoA-2 sobre la actividad transcripcional de los mutantes GRdim y GRmon

Múltiples resultados mostrados en los capítulos 6 y 7 sugieren que las mutaciones presentes en GRmon alteran la interacción con el coactivador (Figura 7.14) y afectan la distribución y la dinámica de este mutante y de NCoA-2 (Figuras 6.6 y 7.9). Por el contrario, la variante GRdim interactúa con NCoA-2 (Figura 7.14) y la distribución y dinámica resultan similares a las que se observa para GR salvaje (Figuras 6.6 y 7.9).

Respecto del ligando 21-OH, nuestro grupo ya demostró previamente que: i) 21-OH no induce un aumento de la actividad luciferasa bajo el control del promotor MMTV en células BHK, ii) la coexpresión de NCoA-2 no aumenta la actividad transcripcional de GR/21-OH y iii) el complejo GR/21-OH no interactúa con NCoA-2 [270]. Los efectos observados en esta Tesis sobre el efecto de mCherry-NCoA-2 en la distribución subnuclear y la dinámica del GR unido a 21-OH (Figuras 6.6 y 7.9) van en la misma dirección que estos resultados previos.

Para avanzar en esta descripción, se propuso evaluar la capacidad de NCoA-2 como coactivador de la función transcripcional de GRmon y GRdim en células estimuladas con Dex. Para ello, se realizaron ensayos de gen reportero luciferasa bajo control del MMTV en células Cos-7, que no expresan GR endógeno. Estos ensayos no pueden hacerse en la línea celular BHK, ya que la actividad del GR endógeno salvaje originaría resultados positivos falsos.

La Figura 7.22 muestra los resultados obtenidos en estos ensayos. De acuerdo con resultados previos, los mutantes GFP-GRdim y GFP-GRmon presentaron una actividad transcripcional mucho menor que la observada para GFP-GR en células estimuladas con Dex (Figura 7.22A, [169]). Sin embargo, la respuesta transcripcional de estos dos mutantes fue diferente cuando se cotransfectaron cantidades crecientes del vector de expresión de mCherry-NCoA-2 en células Cos-7 estimuladas con Dex (Figura 7.22B). Mientras que NCoA-2 favoreció

la actividad transcripcional de GRdim incluso a niveles relativos mayores a los observados para el GR salvaje, no moduló la actividad transcripcional del GRmon (Figura 7.22B).

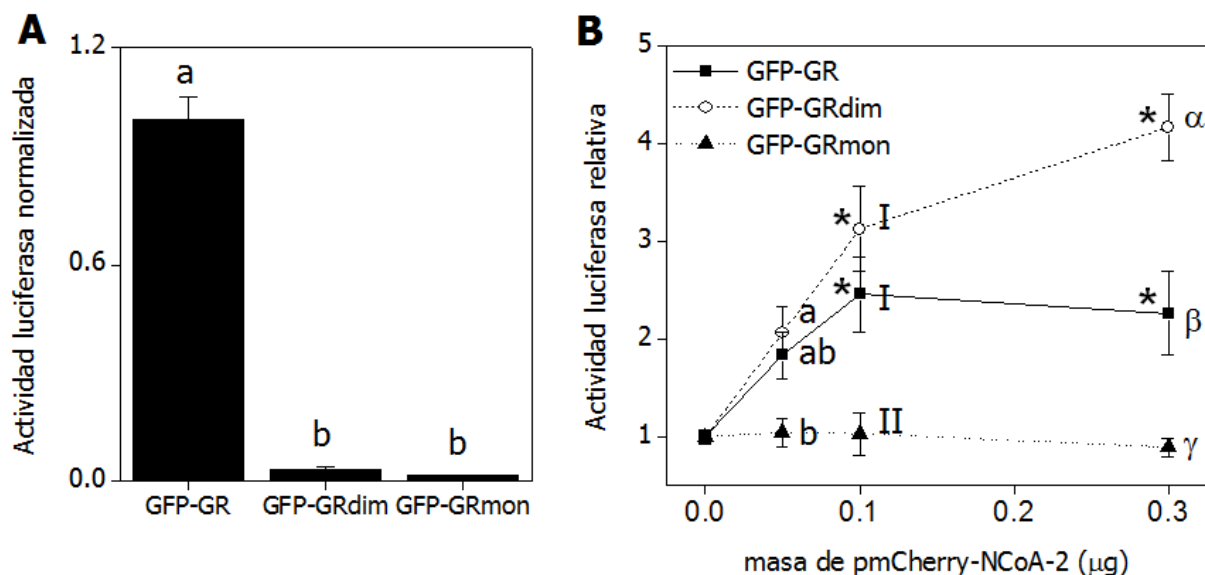


Figura 7.22. Análisis de gen reportero: efecto de NCoA-2 sobre los mutantes GRdim y GRmon. Células Cos-7 se transfectaron con lacZ, MMTV-luciferasa y GFP-GR, GFP-GRdim o GFP-GRmon en ausencia **(A)** o presencia de cantidades crecientes de mCherry-NCoA-2 **(B)**. En todos los casos, las células se trataron con Dex por 18 h y se determinó la actividad luciferasa. Esta actividad se relativizó por la actividad β-galactosidasa. Los valores se expresan normalizados por la actividad de células transfectadas con GFP-GR **(A)** o relativos a la actividad determinada en células no transfectadas con mCherry-NCoA-2 **(B)**. **(A)** Las barras con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$). **(B)** Los asteriscos indican diferencias significativas entre el tratamiento y su respectivo control sin mCherry-NCoA-2 ($p < 0.05$); Tratamientos con distintos símbolos indican diferencias significativas entre GFP-GR, GFP-GRdim y GFP-GRmon para una misma dosis de mCherry-NCoA-2 ($p < 0.05$).

Estos resultados son compatibles con los observados al analizar la distribución y la dinámica de ambos mutantes y el coactivador (Figuras 6.6, 7.9 y 7.14), respaldando fuertemente la hipótesis de que GRdim y NCoA-2 pueden interactuar funcionalmente, mientras que esta interacción con el coactivador está comprometida severamente en el caso de GRmon.

7.9. Conclusiones parciales

En este capítulo se analizó la dinámica intranuclear del GR y de NCoA-2, las interacciones de estas proteínas entre sí y con la cromatina, y cómo estos aspectos pueden ser afectados por el uso de ligandos y mutantes que presentan diferentes propiedades en su actividad transcripcional.

La dinámica de GR en el núcleo puede ser descrita por un modelo que considera una fracción que difunde libremente y una fracción unida a dos poblaciones de sitios fijos que difieren en su tiempo de residencia característico (lentos y rápidos). Mientras que los sitios más rápidos podrían representar eventos de unión inespecíficos a la cromatina, los sitios lentos podrían representar interacciones más específicas con determinadas secuencias en el ADN. De hecho, tanto la unión de un agonista como Dex como la expresión de NCoA-2 favorecen la unión del GR a los sitios lentos. Además, el receptor exhibe una dinámica de interacción similar sobre un arreglo de cientos de secuencias GRE insertado en el genoma de una línea celular.

El uso de distintos ligandos y mutantes muestra diferencias en la dinámica intranuclear del GR y sus interacciones con la cromatina. Si bien el GR unido al ligando disociado 21-OH posee una movilidad similar a la de GR/Dex, su capacidad de interacción con NCoA-2 se encuentra alterada, de modo que la expresión del coactivador no favorece la unión del receptor a los sitios lentos de la cromatina. Además, GR/21-OH no es reclutado eficientemente a un arreglo de sitios GRE. Estos resultados son consistentes con la incapacidad de GR/21-OH de transactivar la expresión génica.

El mutante GRmon presenta una movilidad intranuclear mucho mayor que la del receptor salvaje, debido a menores interacciones con la cromatina. En consistencia con su incapacidad de transactivar la expresión génica, GRmon/Dex no se recluta eficientemente a un arreglo de GRE. Además, la interacción de este mutante con NCoA-2 también está alterada, y la expresión del coactivador no aumenta la actividad transcripcional de GRmon/Dex en un promotor conteniendo GRE. Hay múltiples alteraciones en esta mutante que podrían explicar sus deficiencias en la actividad transcripcional.

El mutante GRdim presenta una dinámica intranuclear muy similar en general a la del receptor salvaje. Su capacidad de interactuar con NCoA-2 y la habilidad del coactivador de incrementar su actividad transcripcional no se encuentran alteradas como en los otros casos.

Incluso este mutante es reclutado eficientemente a un arreglo de GRE. Por lo tanto, estos aspectos no logran explicar por qué GRdim tiene alterada su capacidad de transactivación de la expresión génica.

Resultados:

8. Análisis de interacciones por “Número y Brillo en dos colores”

En este trabajo de Tesis, se han estudiado interacciones entre biomoléculas en células vivas. En particular, se realizaron ensayos de espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS) para analizar de manera cuantitativa las interacciones intranucleares entre GR y NCoA-2 (Figura 7.13). Mediante FCCS se pudieron calcular las concentraciones de GR y NCoA-2 libres y del heterocomplejo GR:NCoA-2, por lo cual se logró determinar una constante de asociación aparente (K_a) entre ambas proteínas (Figura 7.14). Para calcular esta K_a debió asumirse una estequiometría 1:1 para el heterocomplejo, ya que ésta no se conoce en la literatura ni puede determinarse de forma sencilla a partir de los experimentos de FCCS. Por esta razón se decidió explorar el uso de técnicas alternativas que permitieran obtener información sobre la estequiometría de la formación de heterocomplejos en células vivas.

En la sección 5.12, se describió el método de Número y Brillo (N&B) diseñado por Digman y col. [378]. Este método permite calcular en cada píxel de una imagen el número promedio de moléculas fluorescentes móviles (directamente proporcional a su concentración molar) y su brillo.

Como se mencionó previamente (sección 5.12.3), el brillo molecular se define como el número de fotones emitidos por segundo por una molécula fluorescente cuando se encuentra en el centro del volumen de observación [378] y es directamente proporcional al estado de homo-oligomerización de las moléculas fluorescentes, ya que la cantidad de fotones emitidos por un homo-oligómero depende proporcionalmente de cuántas moléculas estén formando este complejo. Por lo tanto, a partir de una calibración del brillo correspondiente a la sonda fluorescente en estado monomérico, es posible determinar si una biomolécula marcada con dicha sonda se encuentra como monómero o si se auto-asocia formando dímeros, trímeros, etc. Si el sistema está integrado por una mezcla de especies con distintos grados de homo-oligomerización, el brillo obtenido es el resultado del promedio del brillo de todas las especies presentes, ponderado por la concentración relativa de éstas.

8.1. Fundamentos del método de N&B en dos colores

En este trabajo de Tesis se ideó una variante de la técnica de N&B en un color para estudiar la estequiometría de heterocomplejos. Se denominó a esta variante como N&B en dos colores (2C-N&B).

Este método requiere marcar las dos moléculas (denominadas *A* y *B*) cuya interacción se quiera analizar con dos fluoróforos que emitan fluorescencia en distintos rangos espectrales. Luego, los datos provenientes de cada canal se analizan por separado por el método de N&B de un color para determinar el estado de homo-oligomerización y las concentraciones totales de *A* y de *B*.

Según la estequiometría de la formación del heterocomplejo, el estado de homo-oligomerización de *A* y/o de *B* puede o no modificarse debido a la reacción de asociación. Por ejemplo, en el caso de la reacción $A + 2B \leftrightarrow AB_2$ el brillo correspondiente a *B* varía de acuerdo al cociente de concentraciones $[AB_2]/[B]$, alcanzando como límite inferior el brillo monomérico de *B* y como límite superior el doble de este brillo, cuando todas las moléculas de *B* se encuentran libres o formando el complejo AB_2 , respectivamente. Por el principio de Le Chatelier, la proporción relativa de AB_2 y *B* en el equilibrio se modifican de acuerdo a las concentraciones totales de *A* y *B* y el valor de la constante de equilibrio.

De esta manera, el fundamento del método de 2C-N&B consiste en la manipulación experimental de las concentraciones intracelulares totales de los dos tipos de moléculas a analizar y el análisis de la dependencia del estado de homo-oligomerización de cada tipo de molécula en función de las concentraciones totales de ambas. Este tipo de análisis permitiría deducir la estequiometría de la formación del heterocomplejo e incluso también explorar su constante de asociación en el interior de células vivas.

8.2. Aplicación del método de número y brillo en un color

La metodología de N&B en un color fue aplicada con éxito en nuestro laboratorio [169] y permitió estudiar los mecanismos de homodimerización del GR dependiente de ligando. En ese estudio, se pudo además observar que la sobreexpresión de GFP-GR en células transfectadas transitoriamente no produce una oligomerización aberrante del receptor [169].

Como se verá más adelante, el método de 2C-N&B implica determinar las concentraciones de biomoléculas y el estado de oligomerización a partir de los parámetros *N* y *B*, respectivamente. Por este motivo, se decidió en una primera instancia explorar experimentalmente la robustez del método en la determinación de estos parámetros.

La Figura 8.1 muestra los resultados obtenidos en un experimento *in vitro* en el cual se determinó los parámetros de número y brillo en soluciones conteniendo distintas concentraciones de fluoresceína. Se puede observar una relación proporcional directa entre N y la concentración molar de fluoresceína, mientras que el brillo molecular se mantuvo constante e independiente de la concentración (Figura 8.1). Este control es similar al que se puede encontrar en bibliografía [378].

La Figura 8.1 también muestra que a concentraciones elevadas de la sonda, el error en el brillo aumenta, posiblemente debido a que el brillo depende de la varianza (Ecuación 5.25) y a altas concentraciones este valor es relativamente menor.

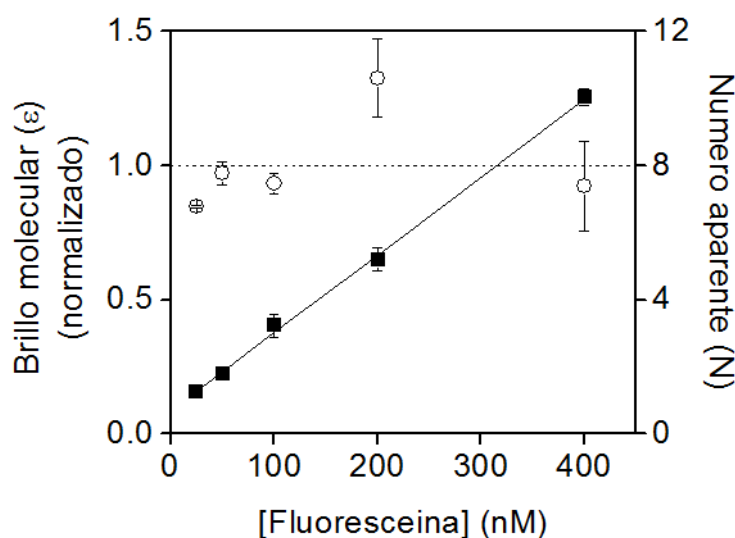


Figura 8.1. Análisis de N&B en soluciones de fluoresceína *in vitro*. Se tomaron imágenes de microscopía confocal para análisis de N&B sobre soluciones con concentraciones conocidas de fluoresceína. Se representan los parámetros de número aparente (N) (cuadrados negros) y brillo molecular (ϵ) (círculos blancos) determinados a partir de este análisis, en función de la concentración de fluoresceína. La línea continua representa un ajuste lineal de los datos de N . La línea punteada representa el brillo promedio.

8.3. Análisis de 2C-N&B a partir de simulaciones de un sistema sencillo

Para explorar el funcionamiento del método de 2C-N&B, se consideró un sistema sencillo que, como se verá más adelante, pudiera también ser analizado experimentalmente. El sistema consistió en moléculas A y B cuya fluorescencia puede ser separada espectralmente formando

dímeros, ya sea AA , AB o BB . Las afinidades de cada tipo de dímero son iguales entre sí, de manera que la concentración de cada dímero depende de las concentraciones relativas de A y B en términos probabilísticos (sección 5.12.2.1.1).

Se realizaron simulaciones de este sistema en las que se varió la abundancia relativa de A y B y se determinaron por un análisis de N&B las concentraciones y el brillo molecular para los canales correspondientes a A y B . El brillo normalizado (respecto al brillo monomérico) en ambos canales se representó en relación a la fracción molar de A (Figura 8.2). Esta fracción molar se calculó a partir del parámetro N determinado en ambos canales.

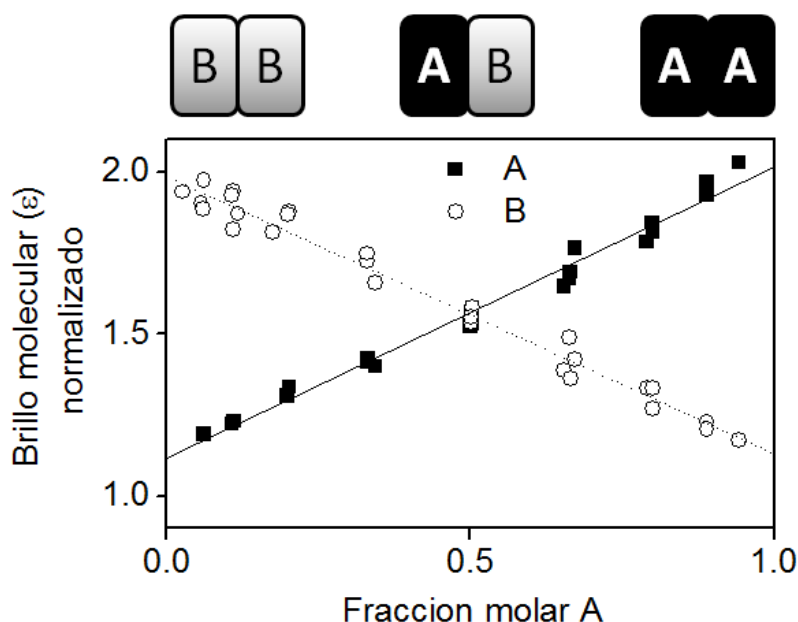


Figura 8.2. Simulaciones de 2C-N&B en un sistema de dimerización. Se consideraron sistemas integrados por moléculas A y B que pueden formar homodímeros AA o BB o heterodímeros AB indistintamente, según la abundancia relativa de cada uno. Se calcularon las concentraciones de cada tipo de dímero para distintas fracciones molares de A según las probabilidades de combinación y se simuló la obtención de imágenes de microscopía confocal para análisis de 2C-N&B para cada sistema. Se representa para ambos canales el brillo molecular (ϵ) normalizado por el brillo monomérico, en función de la fracción molar de A , determinada a partir del número aparente (N) en cada canal. Las líneas continuas representan ajustes lineales de las series de datos.

La Figura 8.2 muestra que el brillo molecular normalizado de *A* adquiere valores entre 1 y 2, dependiente de la cociente $[A]/([A]+[B])$. Este valor es máximo cuando su fracción molar es 1, ya que todos los dímeros son *AA* y es mínima cuando su fracción molar es 0, ya que la probabilidad de encontrar dímeros *AA* es muy baja. Con fracciones molares intermedias, los valores de brillo son también intermedios entre 1 y 2, de acuerdo a la abundancia relativa de los dímeros *AA* y *AB* que se forman.

De manera simétrica ocurre para el canal correspondiente a las moléculas *B*.

8.4. Análisis de 2C-N&B a partir de simulaciones de un sistema complejo

Con el objetivo de analizar los alcances de esta técnica en la determinación de la estequiometría de heterocomplejos, se consideró un sistema más complejo que el descrito en la sección anterior. En particular, se analizó un sistema descrito por la siguiente reacción: $A + 2B \leftrightarrow AB_2$, con constante de asociación *K*.

Tal como se explicó en la sección 8.1, se esperaba por Le Chatelier que un aumento en las concentraciones absolutas de *A* y *B* produzca una mayor formación de complejo. Teniendo en cuenta que la fluorescencia de *A* y *B* puede ser separada espectralmente en distintos canales, el brillo molecular en el canal correspondiente a *B* funciona como testigo de la abundancia relativa del complejo en el sistema, ya que cuando el brillo es 1, todas las moléculas de *B* se encuentran libres y cuando el brillo es 2 todas las moléculas de *B* se encuentran formando el complejo *AB*₂. Por otro lado, el brillo en el canal correspondiente a *A* debería mantenerse constante ya que su estado de homo-oligomerización no cambia con la formación del heterocomplejo.

Para examinar cuantitativamente las expectativas respecto a análisis de 2C-N&B sobre el sistema mencionado, se realizó una predicción teórica, matemática, de experimentos de este tipo. A partir de la constante de equilibrio de esta reacción y de las concentraciones totales de *A* y de *B*, es posible calcular las concentraciones de cada especie en el equilibrio y por lo tanto los brillos esperado para este sistema (secciones 5.12.2.1.2. y 5.12.4.). Esto permitió construir gráficos 3D en donde se representa el brillo calculado en el canal *B* (en escala de colores) en función de el número de moléculas totales de *A* y *B*, para 3 valores distintos de constante de equilibrio *K* (Figura 8.3). Por otra parte se realizaron simulaciones de experimentos de 2C-N&B

sobre los mismos sistemas, se recuperaron los parámetros de N y brillo, y se construyeron los gráficos 3D correspondientes (Figura 8.3).

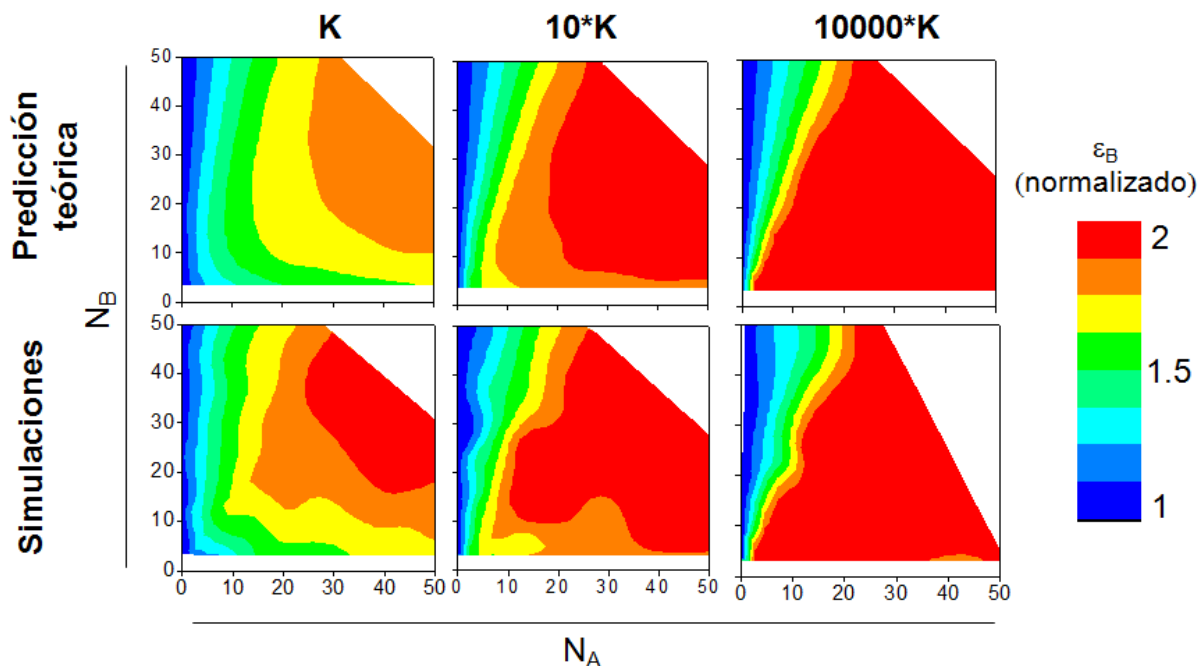


Figura 8.3. Predicción teórica y simulaciones de ensayos de 2C-N&B. Se consideró un sistema formado por moléculas *A* y *B* emitiendo fluorescencia en distintos canales y que pueden formar el heterocomplejo AB_2 con constante de asociación K . A partir de la ecuación de equilibrio se calcularon las concentraciones de cada especie de acuerdo a las concentraciones totales de *A* y de *B*. Para sistemas con diferentes valores de K (10^{-4} , 10^{-3} y 1) y para distintas concentraciones totales de *A* y *B*, se calculó el brillo molecular (ϵ) correspondiente al canal de *B*, normalizado por su brillo monomérico (**A**), o se simuló la obtención de imágenes para análisis de 2C-N&B (**B**). Se determinaron el brillo molecular (ϵ) correspondiente al canal de *B*, normalizado por su brillo monomérico, y el número aparente de *A* y de *B* a partir de este análisis.

Los valores máximos de brillo normalizado (2 para *B* y 1 para *A*, no mostrado ya que, como se explicó previamente, es constante) brindan información sobre la estequiometría de la asociación (1*A*:2*B*) (Figura 8.3). Por otro lado, la forma en que el brillo aumenta en relación a las concentraciones totales de *A* y *B* brinda información sobre la constante de asociación (Figura 8.3). De esta manera, cuando K es alta se alcanza el brillo máximo a concentraciones de *A* y *B* menores que cuando K es baja. Los resultados obtenidos por simulaciones son

similares a los esperados de acuerdo a la predicción teórica, aunque con un ruido mayor (Figura 8.3).

8.5. Análisis de 2C-N&B a partir de datos experimentales

Como punto de partida, se decidió aplicar el método de 2C-N&B a un proceso de asociación entre moléculas de estequiometría conocida para analizar los alcances y limitaciones del método en células vivas. En particular, se decidió explorar la homodimerización del GR [169] utilizando células que expresaban GR fusionado a dos fluoróforos distintos, GFP o mCherry, con el objetivo de poder determinar la estequiometría del complejo GFP-GR:mCherry-GR.

Se comprobó inicialmente que en en núcleo de células 3617 transfectadas únicamente con GFP-GR o con mCherry-GR la estimulación con Dex induce una homodimerización completa del receptor, duplicando el brillo respecto a la condición control (células sin estimular) y a las proteínas fluorescentes GFP o mCherry libres en el núcleo (Figura 8.4). El hecho de que la homodimerización sea completa sugiere que la concentración de GR monomérico es despreciable en las condiciones experimentales. Por este motivo, se consideró que la constante de asociación GR:GR es elevada.

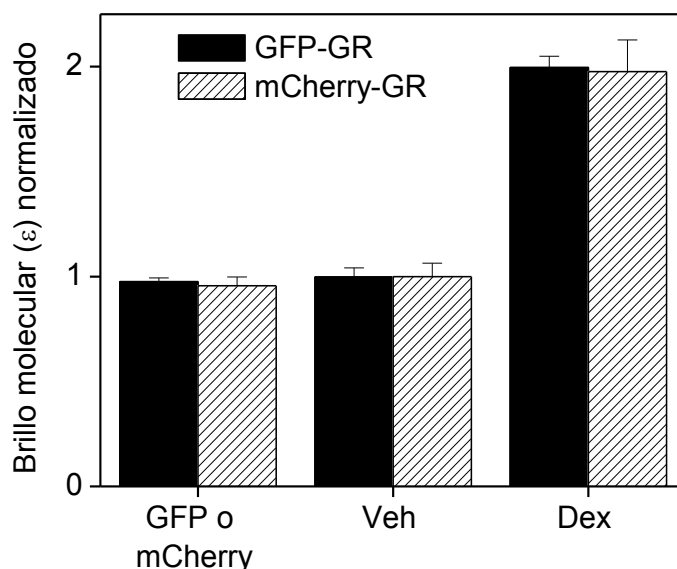


Figura 8.4. Análisis de N&B de GFP-GR y mCherry-GR en células vivas. Células 3617 fueron transfectadas con GFP, mCherry, GFP-GR o mCherry-GR. Luego se les agregó vehículo o Dex y se tomaron imágenes de microscopía confocal para análisis de N&B. Se determinó el brillo molecular (ϵ) promedio para cada condición. Se representan los brillos moleculares normalizados por el valor promedio de GFP o mCherry, según corresponda.

La coexistencia de GFP-GR y mCherry-GR permitiría la formación de tres tipos distintos de dímeros: los homodímeros GFP-GR:GFP-GR y mCherry-GR:mCherry-GR y los “heterodímeros” GFP-GR:mCherry-GR. Este sistema sería en teoría equivalente al considerado en las simulaciones que se muestran en la sección 8.3.

Como consecuencia, se cotransfectaron los vectores codificantes para GFP-GR y mCherry-GR en proporciones variables en células 3617 (proporciones entre 6:1 y 1:6), con el fin de generar un rango amplio de fracciones molares de estas dos proteínas fluorescentes. Las células se estimularon con Dex y se determinaron las concentraciones relativas y los brillos moleculares simultáneamente para ambos canales en los núcleos de las mismas células.

La representación del brillo normalizado de GFP-GR y mCherry-GR en relación a la fracción molar de GFP-GR mostró un resultado similar al de las simulaciones (Figuras 8.2 y 8.5), aunque con una dispersión mucho mayor (Figura 8.5).

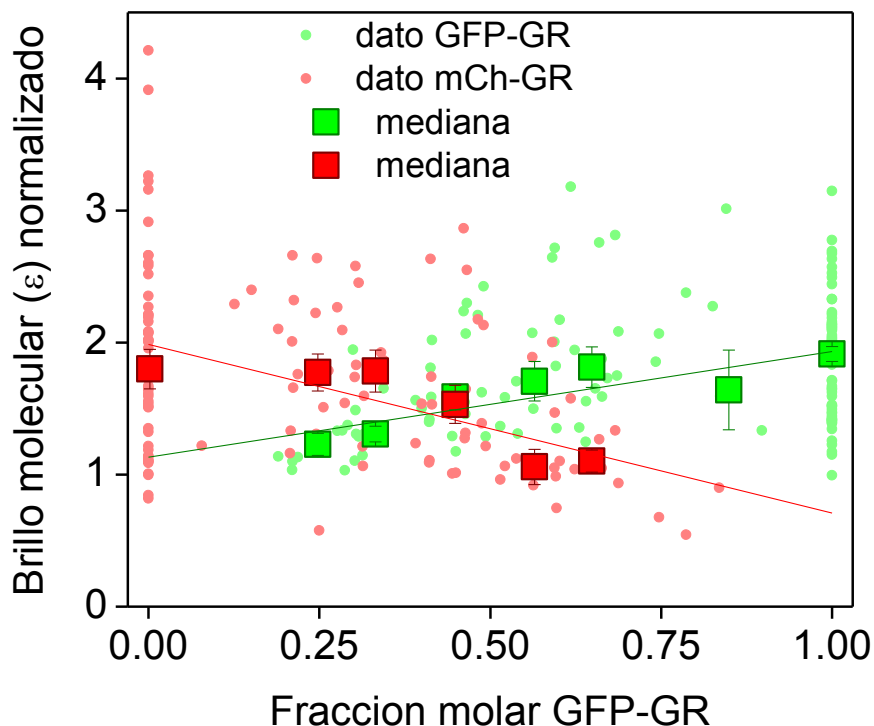


Figura 8.5. Análisis de 2C-N&B de GFP-GR y mCherry-GR en células vivas. Células 3617 fueron cotransfectadas con cantidades variables de GFP-GR y mCherry-GR y tratadas con Dex. Se tomaron imágenes de microscopía confocal para análisis de 2C-N&B. Se representa el brillo molecular (ϵ) normalizado por el brillo monomérico, en función de la fracción molar de GFP-GR, determinada a partir del número aparente (N) en cada canal. Los puntos representan datos de células individuales. Los cuadrados representan medianas de grupos de datos, agrupados de acuerdo a la fracción molar de GFP-GR. Los ajustes lineales (líneas continuas) se hicieron sobre las medianas.

Este resultado demuestra que, por un lado, el brillo determinado en uno de los canales depende de las concentraciones relativas de ambos tipos de moléculas, debido a la formación de heterocomplejos. Las concentraciones relativas de cada proteína pueden ser moduladas según la masa de plásmido transfectada, y a su vez una masa fija de transfección genera una distribución de expresión de cada proteína [396]. Por otro lado, queda en evidencia la gran dispersión de datos de brillo que se obtiene mediante esta técnica en células vivas, que pueden deberse ya sea a la variabilidad intercelular como a la pobre sensibilidad de los detectores. Esto no implica que la técnica no funcione en células vivas pero sí requiere la adquisición de una gran cantidad de medidas con fines estadísticos.

8.6. Conclusiones parciales

En este capítulo se desarrolla una variante de la técnica de Número y Brillo (N&B) en dos colores, denominada 2C-N&B, y se muestran ejemplos en los que puede ser utilizada. El análisis de N&B permite determinar estados de oligomerización (a partir de los brillos moleculares) y concentraciones molares. La aplicación de 2C-N&B tiene como objetivo evaluar la estequiometría y la constante de asociación de heterocomplejos de biomoléculas en células vivas.

El fundamento de la técnica se basa en que, de acuerdo a la estequiometría de la reacción de asociación involucrada, el brillo molecular en alguno de los canales de detección de fluorescencia puede depender de la relación de concentraciones entre especies en el equilibrio, si la reacción implica un cambio en el estado de oligomerización de alguna de las proteínas involucradas. Esta relación puede modularse variando las concentraciones totales de cada proteína.

El análisis puede realizarse representando los datos de brillo molecular en función de concentraciones totales en gráficos 3D. La estequiometría de la reacción se puede obtener a partir del valor máximo de brillo y un valor relativo de la constante de asociación a partir de la forma en que el brillo aumenta en función de las concentraciones.

El método puede ser llevado a cabo en células vivas. Las concentraciones totales de las dos proteínas involucradas pueden manipularse mediante el protocolo de transfección, y la distribución normal de distintos niveles de expresión en transfecciones transitorias aporta un rango más amplio de variedad de concentraciones totales. Por su parte, se verificó que el brillo molecular puede variar según lo esperado de acuerdo a la abundancia relativa de dos proteínas estudiadas que se asocian.

9. Discusión

El GR ha sido estudiado exhaustivamente por su interés farmacológico [397]. Además, su gran versatilidad estructural y funcional determina que sea considerado un modelo para el estudio de los mecanismos de acción de los TF. El uso de distintos ligandos permite favorecer distintos tipos de conformaciones del receptor y manipular de manera externa su actividad [349, 398]. Su estructura proteica modular con dominios funcionales bien definidos posibilita también manipular mediante mutaciones diferentes propiedades del receptor [155].

Además, el GR interactúa con múltiples vías de señalización y con miles de elementos de respuesta en el genoma, regulando así la expresión génica a través de mecanismos moleculares muy diversos [217, 399]. Esta promiscuidad resulta en una respuesta transcripcional difícil de interpretar.

Desde las perspectivas de la biofísica y la biología celular, la acción del GR está asociada a una gran riqueza de fenómenos. El más claro y simple que muestra la relevancia de la dinámica y la distribución espacial en el modo de acción del receptor es su drástico y rápido cambio en la localización subcelular tras su activación, del citoplasma al núcleo. La acumulación del GR en dominios focales nucleares y su capacidad de unión a la cromatina han sido explorados como fenómenos independientes [254, 270, 320, 334, 348, 349, 357, 360, 362, 400].

En este trabajo de Tesis la dinámica y la distribución espacial del GR han sido tratadas de manera integral, entendiendo el conjunto de interacciones del receptor en el núcleo en el marco de su arquitectura espacial e indagando en los aspectos dinámicos de estas interacciones.

A continuación se discutirán los aspectos más relevantes encontrados durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, relacionados con la distribución y la dinámica del receptor. Finalmente, se discutirá si estas propiedades pueden vincularse al mecanismo de acción del GR como modulador de la expresión génica, integrando el conjunto de los resultados de esta Tesis con datos bibliográficos.

9.1. Distribución espacial de GR/Dex y el coactivador NCoA-2

La unión de un agonista completo como Dex provoca numerosos cambios en la distribución y la dinámica del receptor, como se ha mostrado a lo largo de esta Tesis. Luego de minutos de agregar la hormona al medio de cultivo (Figura 6.9), se produce el cambio de distribución subcelular del GR, que pasa de estar localizado tanto en citoplasma como en el núcleo a confinarse casi totalmente en el compartimento nuclear (Figura 6.1). Este cambio de localización concentra al GR en la organela que contiene el ADN, donde están sus sitios de acción. Una vez en el núcleo, el receptor activo se enfrenta a un *paisaje* de interacciones que determina una organización espacial compleja.

A diferencia del receptor sin ligando, GR/Dex se distribuye en múltiples *foci* dentro del núcleo (Figuras 6.1 y 6.4), que se forman progresiva y simultáneamente a medida que GR transloca a esta organela (Figura 6.9). La distribución subnuclear de GR/Dex en *foci* sufre una gran perturbación global frente a la digestión con DNasa I (Figura 6.10), por lo tanto se deduce que el ADN juega un papel estructural relevante en la integridad de estos *foci*. El intercambio de moléculas entre el nucleoplasma y los *foci* evaluado por ensayos de FCS de barrido reveló además que los *foci* son estructuras dinámicas ya que exhiben un recambio relativamente rápido de GR con el nucleoplasma. GR/Dex se une y se libera de los *foci* con un tiempo de residencia cercano a 1 s (Figura 6.15). Schaaf y col. [349] hallaron por FRAP que el GR presenta una reducción de su movilidad en regiones conteniendo *foci*, con un tiempo característico de recuperación de fluorescencia de 1-2 s. Sin embargo, en estos ensayos se fotoblanquearon regiones que abarcaban *foci* y nucleoplasma. Nuestros experimentos de FCS de barrido permiten abordar la dinámica del GR en un *focus* con una mayor resolución espacial ($\sim 0.2 \mu\text{m}$) y temporal (5 ms). Según nuestro conocimiento, no hay otros trabajos en los que se haya analizado la dinámica del receptor en los *foci*, pese a que éstos han sido descritos hace más de dos décadas.

NCoA-2 es uno de los coactivadores de la familia p160, relevante en la actividad del GR como TF [224, 232, 243]. Al interactuar tanto con el receptor como con remodeladores de la cromatina y enzimas modificadoras de histonas, media la acción de receptores nucleares sobre la maquinaria transcripcional [232]. NCoA-2 se localiza preferencialmente en el núcleo y, en ausencia de hormona esteroide, se acumula en grandes dominios focales subnucleares (Figura

6.5). La colocalización de estos dominios con la proteína PML permitió identificarlos como cuerpos nucleares PML (Figura 6.5), en concordancia con la literatura [382].

En trabajos previos se estudió la relación que existe entre los cuerpos PML y NCoA-2. En particular, Baumann y col. [382] propusieron que estos cuerpos nucleares regulan la estabilidad del coactivador mediante degradación proteasomal. Esta observación es compatible con nuestros resultados, que sugieren que los cuerpos PML representan un compartimento en el que NCoA-2 se encuentra secuestrado, inactivo. Por otra parte, Liu y col. [401] hallaron que la proteína PML puede potenciar la actividad de NCoA-2. Además, el reclutamiento a cuerpos PML depende de la región AD1 del coactivador, responsable de la interacción con la acetiltransferasa de histonas CBP [382], que también localiza en cuerpos PML [402]. Estas dos observaciones permitirían proponer como hipótesis que la localización del coactivador en los cuerpos PML constituye un paso previo, necesario, en su vía de activación.

Además, existen evidencias que muestran que los cuerpos PML estarían involucrados en las vías de señalización del GR. Por ejemplo, el secuestro del correpresor del GR Daxx en cuerpos PML produce un aumento de la actividad transcripcional del receptor [77], aunque otros autores vinculan este aumento de actividad del GR con la asociación entre la proteína PML y CBP [403]. De manera similar, se observó que los cuerpos PML son capaces de reclutar otros interactores que pueden modular la actividad transcripcional del GR, como p53, Rb y SUMO-1 [382, 404-407]. En este contexto, los resultados presentados en esta Tesis abren un interesante panorama para investigar el rol de los cuerpos PML en la vía de acción del receptor.

La activación del GR por unión de Dex induce un cambio significativo en la distribución subnuclear de NCoA-2. De manera simultánea a la translocación de GR/Dex al núcleo y la formación de *foci*, ocurre una redistribución de NCoA-2 desde los cuerpos PML hacia los *foci* formados por GR/Dex (Figuras 6.5, 6.8 y 6.9). No sólo se observó que GR/Dex y NCoA-2 colocalizan en estos *foci* (Figura 6.9), sino que se demostró que las proteínas están formando heterocomplejos sobre estas estructuras (Figura 6.15). Esta redistribución dependiente de Dex es reversible (Figura 6.5) y no ocurre en ausencia de cotransfección transitoria de GR (Figura 6.5), es decir que los niveles endógenos del receptor no son suficientes para visualizar el cambio en la distribución. Estos resultados sugieren que la redistribución depende de interacciones físicas entre GR/Dex y NCoA-2, de manera que el receptor activo traccione al coactivador hacia los *foci*. Esto podría ocurrir por un reclutamiento directo de GR/Dex a los

cuerpos PML y/o por un desplazamiento de los equilibrios entre diferentes subcompartimentos nucleares. La localización de NCoA-2, como la de cualquier otra proteína, es el resultado de múltiples equilibrios en juego, y una modulación relativamente rápida en su distribución requiere un intercambio dinámico de las moléculas involucradas entre los diferentes subcompartimentos. De hecho, por FCS de barrido se observó que NCoA-2 posee un tiempo de residencia de ~2 s en los cuerpos PML y ~0.5 s en los *foci* (Figura 6.15).

El análisis de las funciones de autocorrelación (ACF) y de correlación cruzada (CCF) que describen la dinámica de GR, NCoA-2 y los complejos GR:NCoA-2 en los *foci* (Figura 6.15), junto con simulaciones pertinentes de distintos escenarios posibles (sección 6.7), contribuyó a la comprensión de cómo estas moléculas interactúan con estas estructuras. Según los resultados, NCoA-2 sólo podría unirse a los *foci* formando parte de un heterocomplejo con GR o uniéndose a moléculas de GR previamente unidas a los *foci*. El complejo GR:NCoA-2 podría liberarse de los *foci* como tal o de manera secuencial, liberándose el coactivador antes que el receptor (Figura 6.21).

La función biológica de los *foci* formados por GR/Dex aún sigue siendo un misterio. La presencia de un coactivador como NCoA-2 en estos *foci* quizá pueda traer algo de luz sobre su función. El hecho de que la activación del GR lleve a NCoA-2 a relocalizarse en los *foci* (Figura 6.5), en los cuales GR y NCoA-2 interactúan (Figura 6.15), permite postular su rol como plataformas de ensamblado de complejos transcripcionales que luego actúan en el genoma. En este sentido, la acumulación en *foci* de los factores involucrados podría favorecer la disponibilidad local de complejos ensamblados en las proximidades de los sitios de acción. Los *foci* podrían funcionar como reservorios locales que regulan la concentración disponible del receptor activo, quizá incluso con un efecto negativo sobre la regulación transcripcional. La presencia de NCoA-2 en los *foci* podría ocurrir por un efecto pasivo, debido a la afinidad que posee por GR/Dex.

La interacción entre GR/Dex y NCoA-2 en el núcleo de células vivas fue confirmada por FCCS (Figura 7.14) pero estas medidas no proveen información relacionada con la estequiometría del complejo. Por este motivo, en este trabajo de Tesis se mostró la aplicación de una variante en dos colores del método de Número y Brillo (2C-N&B), que permite analizar la estequiometría de heterocomplejos (capítulo 8). El método se basa en calcular la concentración y el índice estequiométrico aparente de dos biomoléculas distintas a partir de los parámetros de número y de brillo molecular, y analizar la dependencia del índice

estequiométrico en función de las concentraciones relativas de ambos tipos de moléculas. La potencialidad de este método se verificó en simulaciones de dos sistemas distintos (Figuras 8.2 y 8.3). Por otra parte, se evaluó la posibilidad de aplicar el método de 2C-N&B en células vivas (Figura 8.5). Si bien los datos de brillo en células pueden presentar una variabilidad intercelular elevada, este resultado aún preliminar muestra que podría ser posible modular la concentración relativa de dos proteínas expresadas transitoriamente y que estas diferencias de concentración relativa se manifestarían en variaciones en el brillo molecular, según lo esperado (Figura 8.5). El complejo GR:NCoA-2 en el núcleo de células estimuladas con Dex es un buen candidato para aplicar el método en células vivas.

9.2. Dinámica intranuclear de GR/Dex

Las interacciones del GR con la cromatina, necesarias para la acción biológica del receptor, se hacen evidentes en la movilidad que del receptor dentro del núcleo. En múltiples trabajos, publicados mayormente durante el desarrollo de esta Tesis, se exploraron aspectos diversos de la dinámica intranuclear del GR mediante técnicas de microscopía de fluorescencia, como FRAP [357, 358, 360], FCS [320, 323, 400], SMT [254, 360-362]. En estos trabajos, generalmente se identifican al menos dos poblaciones de moléculas de GR que difieren en su dinámica. Para describir datos de FCS, por ejemplo, se han utilizado modelos de dos componentes difusivos [320] o de un componente difusivo y otro unido a sitios fijos [323]. Se ha descrito que la movilidad del GR puede ser modulada por el uso de ligandos y mutantes que varían la conformación del receptor [357, 358, 360, 400].

En este trabajo de Tesis, los datos de FCS de punto único de GR en el núcleo se interpretaron de acuerdo al modelo de reacción dominante, propuesto por Michelman y col. [290] para describir las interacciones entre proteínas y ADN. Este modelo permite obtener constantes de disociación k_{off} , que son recíprocos de los tiempos de residencia.

Los datos de FCS se describieron considerando la existencia de una fracción difusiva con su coeficiente de difusión libre y dos fracciones unidas a dos tipos de sitios –rápidos y lentos– con sus respectivos tiempos de residencia (Figura 7.3). En nuestro sistema, ~50% de las moléculas de GR/Dex están implicadas en unión a la cromatina, repartidas entre sitios lentos y rápidos, con tiempos de residencia de ~500 y ~50 ms, respectivamente (Figura 7.4).

Tradicionalmente en la literatura se han asignado los tiempos lentos de interacción a los resultantes de la unión específica del TF a sus elementos de respuesta en el genoma, y las interacciones más rápidas a la unión inespecífica del TF a la cromatina. Sin embargo, esta asociación no es necesariamente cierta. Pueden existir interacciones rápidas biológicamente relevantes y a su vez interacciones lentas con, por ejemplo, ciertos reservorios nucleares que no impliquen la ejecución de alguna función biológica directa.

La escala temporal de los eventos específicos de unión del GR y de los TF en general a sus secuencias *blanco* suscita controversias en la literatura. Mikuni y col. [320] determinaron por FCS una fracción lenta del GR con un $D=0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$, es decir, con un tiempo característico de ~ 100 ms, en una escala temporal intermedia entre las interacciones lentas y rápidas detectadas en esta Tesis. En cambio, a partir de experimentos de FRAP se establecieron tiempos de recuperación un orden de magnitud más lentos para el GR [349, 357-359].

En el último lustro, los experimentos de SMT han dominado los estudios de la dinámica de TF. A partir de este tipo de ensayos, se determinaron eventos de unión en el rango de 2-8 s y se consideraron a los eventos detectados en la escala temporal < 1 s como interacciones inespecíficas y/o difusión lenta [254, 360-362, 408]. Es decir, según esta concepción, todas las interacciones detectadas en esta Tesis por FCS deberían ser inespecíficas. Existen razones técnicas y biológicas que podrían explicar estas discrepancias.

Por un lado, la adquisición de datos en SMT es lenta (10-100 Hz), por lo cual permite detectar interacciones de relativamente larga duración y poco frecuentes, mientras que en FCS los datos se adquieren a altas frecuencias (50000-100000 Hz), de manera que se favorece la detección de eventos rápidos y altamente representativos de la población de eventos totales. Por otro lado, la asunción de que existe un único tiempo de residencia característico de interacciones específicas puede no ser válida. De hecho, las interacciones del GR con el ADN dependen de la estructura local de la cromatina [361]. Las interacciones específicas e inespecíficas pueden abarcar espectros amplios de la escala temporal e incluso estos rangos pueden solaparse entre sí [328]. En este sentido, es probable que las interacciones entre los TF y la cromatina abarquen un continuo de tiempos de residencia y que no sea sencillo definir las poblaciones únicamente de acuerdo a los tiempos característicos de interacción. Por lo tanto, FRAP, FCS y SMT pueden detectar preferencialmente eventos en determinadas escalas temporales, muestreando diferentes porciones del continuo de interacciones existentes.

A lo largo de esta Tesis se han presentado evidencias que sugieren que las interacciones lentas (~500 ms) detectadas en experimentos de FCS en el nucleoplasma representan interacciones funcionalmente relevantes, a pesar de que estos ensayos no permiten conocer la región de unión a la cromatina. En particular:

i) se detectaron interacciones lentas en la misma escala temporal en el arreglo MMTV, que contiene cientos de secuencias específicas GRE (Figura 7.19);

ii) además, la activación del GR por unión de Dex produce un aumento significativo de la fracción unida a los sitios lentos y de su tiempo de residencia en estos sitios (Figura 7.4);

iii) la coexpresión de NCoA-2 promueve a su vez un retardo aun mayor de la movilidad de GR/Dex, aumentando la fracción unida a sitios lentos (Figura 7.10).

Es decir, este tipo de interacciones se ve selectivamente favorecido por la activación hormonal del receptor y por la interacción con el coactivador. De hecho, la estimulación con Dex del GR provoca un aumento notable de la unión de NCoA-2 a los sitios lentos y de su tiempo de residencia, a expensas de la fracción unida a los sitios rápidos (Figura 7.12). Dado que NCoA-2 es un coactivador y no posee capacidad de unirse directamente al ADN, ésta depende del reclutamiento del GR activo.

Es preciso notar que el aumento de la fracción unida del GR a los sitios lentos debido a su activación (Figura 7.4) no se da a expensas de la fracción unida a sitios rápidos sino de la población difusiva. Esta observación ilustra cómo proteínas con distintas funciones biológicas presentan una distribución distinta en los diferentes reservorios de sitios de interacción que presenta la cromatina.

El análisis de la dinámica de GR/Dex sobre el arreglo MMTV también reveló la existencia de una población que presenta interacciones rápidas, con tiempos de residencia de ~40 ms (Figura 7.19), similar a los determinados en los experimentos de FCS de punto único.

Se ha postulado que las interacciones rápidas entre TF y cromatina representan uniones inespecíficas del TF al ADN, incluyendo los mecanismos de deslizamiento (*DNA sliding*) y salto (*DNA hopping*) [282, 317, 342, 409, 410]. Estas interacciones rápidas tendrían relevancia funcional dado que formarían parte del mecanismo de búsqueda de sitios *blanco* específicos en el ADN [304, 338, 346]. En este sentido, esta población de sitios funcionaría como otro reservorio o subcompartimento nuclear que recluta transitoriamente al TF y modula

su disponibilidad, a nivel local y a nivel nucleoplásmico. En el mismo arreglo MMTV, la unión inespecífica a este tipo de sitios podría facilitar el reclutamiento del GR a las secuencias *blanco*.

9.3. Dinámica y organización nuclear de GR/21-OH

El esteroide sintético 21-OH fue diseñado racionalmente en el marco de la búsqueda de ligandos selectivos del GR con propiedades disociadas, es decir, que pudieran promover los efectos anti-inflamatorios asociados a la transrepresión génica sin inducir la activación de los genes responsables de efectos no deseados farmacológicamente (revisado en [272]).

En trabajos previos de nuestro grupo, se han caracterizado tanto la actividad transcripcional del GR unido a 21-OH como su estructura, lo que ha permitido sugerir mecanismos posibles por los cuales este ligando se comporta de manera diferente a un agonista. En particular, se observó que 21-OH posee propiedades anti-inflamatorias e inmunosupresoras y es capaz de ejercer transrepresión génica [269-271], pero es incapaz de inducir la expresión de genes bajo el control de secuencias GRE [267, 269].

Por otra parte, simulaciones de dinámica molecular sugieren que la unión de 21-OH al GR afecta una región de dimerización y el dominio AF-2 de unión a coactivadores como NCoA-2 [269], como se evidencia en ensayos de co-inmunoprecipitación [270]. De todas maneras, se demostró que GR/21-OH homodimeriza a través de otra interfaz de dimerización [169], de modo que su actividad no se relaciona con su estado de oligomerización.

La menor interacción entre GR/21-OH y NCoA-2 se confirmó mediante FCCS en el núcleo de células vivas (Figura 7.14). Además, se encontraron evidencias indirectas que apoyan la idea de que la interacción de GR/21-OH con NCoA-2 se encuentra afectada: NCoA-2 permanece en cuerpos PML en presencia de GR/21-OH (Figura 6.6) y la sobreexpresión de NCoA-2 no altera el tiempo de residencia ni la fracción de GR/21-OH unida a los sitios lentos (Figura 7.10). Estos fenómenos dependerían de la interacción física entre ambas proteínas y contrastan con lo que ocurre con el GR cuando se encuentra unido a Dex (Figuras 6.5 y 7.10). Por otra parte, otra demostración indirecta de este fenómeno es la imposibilidad de NCoA-2 de inducir la actividad transcripcional de GR/21-OH en ensayos de gen reportero [270]. El conjunto de los resultados de esta Tesis y los de la bibliografía sugieren que la alteración de la

interacción con el coactivador NCoA-2 podría explicar la incapacidad del GR unido a 21-OH de inducir en forma directa la expresión génica.

Por otra parte, existen otras diferencias en la distribución y la dinámica de GR/21-OH con respecto a las de GR/Dex que podrían explicar sus defectos transcripcionales y que no parecen estar ligadas a su incapacidad de interactuar con NCoA-2. Por un lado, GR/21-OH tiene una capacidad menor que GR/Dex de formar *foci* subnucleares (Figura 6.4 y [270]). Además, GR/21-OH presenta un reclutamiento mucho menor al arreglo MMTV (Figura 7.16). Este resultado apoya su incapacidad de inducir genes dependientes de GRE [269, 270].

Para nuestra sorpresa, la dinámica de GR/21-OH en posiciones aleatorias dentro del núcleo resultó muy similar a la de GR/Dex, en ausencia de sobreexpresión de NCoA-2 (Figura 7.5). La unión tanto a los sitios lentos como a los sitios rápidos fue similar. Considerando que el reclutamiento de GR/21-OH al arreglo de GRE es bastante menor (Figura 7.16), este resultado sugiere que al menos la mayoría de los sitios de unión detectados por FCS de punto único no corresponden a GRE. En este sentido, GR/21-OH podría estar reclutándose en forma indirecta a otros tipos de sitios en el genoma, por ejemplo elementos de unión de AP-1 [411], y regular así la transrepresión de ciertos *blancos* de la acción del GR.

9.4. Dinámica y organización intranuclear de GRdim

El estudio del mutante GR^{A465T} de ratón, denominado GRdim, permitió construir originalmente el modelo disociado de acción del GR (sección 2.6) y se basó en la presunción de que este mutante era monomérico. Sin embargo, posteriormente se demostró su capacidad de inducir la expresión génica en ciertas condiciones [162, 251, 252] y que mayoritariamente se encontraba formando dímeros en células vivas [169, 253]. Estas últimas observaciones llevaron a cuestionar el modelo disociado y a postular explicaciones alternativas para los defectos transcripcionales de GRdim [169].

Se ha postulado, por ejemplo, que una interacción defectuosa con corre reguladores podría explicar la incapacidad transcripcional de GRdim [162]. Sin embargo, en lo que refiere a la interacción con NCoA-2, los resultados de esta Tesis indican que la interacción de este mutante con ese coactivador es similar a la del GR salvaje. Esta conclusión se respalda principalmente en la evidencia directa al estimar por FCCS la constante de asociación entre GRdim y NCoA-2 en presencia de Dex (Figura 7.14). También otros resultados demuestran

indirectamente que GRdim puede interactuar eficientemente con NCoA-2: este mutante es capaz de redistribuir a NCoA-2 en presencia de Dex desde los cuerpos PML a *foci* como lo hace el receptor salvaje (Figura 6.5), la sobreexpresión de NCoA-2 aumenta la unión de GRdim/Dex a los sitios lentos (Figura 7.10) y el coactivador es capaz de promover la actividad transcripcional de GRdim/Dex en ensayos de gen reportero pese a que su actividad basal es mucho menor que la del GR salvaje (Figura 7.22). Estos resultados sugieren que GRdim puede interactuar eficientemente con NCoA-2, y que ésta no es la causa de su defecto transcripcional.

Por otra parte, la dinámica y la organización intranucleares de GRdim se asemejan a las del GR salvaje. Este mutante tiene la capacidad de formar *foci* subnucleares en presencia de Dex al igual que el GR (Figura 6.4) y tanto el reclutamiento como la dinámica de ambos tipos de receptores sobre el arreglo MMTV de GRE son similares (Figuras 7.16 y 7.21). Si bien un análisis cualitativo de las curvas de ACF de GR y GRdim indica que las movilidades intranucleares de estas dos proteínas son parecidas tanto en ausencia (Figura 7.8) como en presencia de Dex (Figura 7.6), el tiempo de residencia de GRdim/Dex en los sitios lentos resultó menor que el de GR/Dex (Figura 7.6). Es importante destacar que esta pequeña diferencia no necesariamente explica la respuesta transcripcional diferente del mutante respecto a la del receptor salvaje. Los resultados aquí presentados describen solamente algunos aspectos del mecanismo de acción del receptor, relacionados con su organización dinámica dentro del núcleo. Si se considera que estos aspectos de la organización nuclear condicionan el reclutamiento del receptor a sus sitios *blanco* y por lo tanto su respuesta transcripcional, se podría suponer que la deficiencia en la actividad transcripcional del GRdim ocurre en algún mecanismo posterior a la unión a los sitios *blanco*, y/o en algún aspecto que no ha sido revelado en el tipo de experimentos realizados en esta Tesis.

9.5. Dinámica y organización intranuclear de GRmon

El mutante denominado GRmon presenta una doble sustitución aminoacídica A465T e I634A (en el ratón) de manera que dos regiones de dimerización se ven afectadas, y en consecuencia este mutante permanece como monómero en células estimuladas [169]. Además, GRmon presenta disminuida su capacidad de unión al ADN y no es capaz de inducir la expresión génica dependiente de GRE [169]. En este trabajo de Tesis, un estudio detallado

de la organización intranuclear de esta versión mutada del receptor reveló otros aspectos en los que presenta un comportamiento diferente si se la compara con el GR salvaje.

En los ensayos de FCCS en el nucleoplasma, se observó una asociación menor de NCoA-2 con GRmon/Dex (Figura 7.14). Esta deficiencia en la interacción se detectó también por ensayos indirectos, ya que GRmon/Dex no logró redistribuir a NCoA-2 desde los cuerpos PML (Figura 6.5) y NCoA-2 no mostró actividad como coactivador de GRmon/Dex en ensayos de gen reportero (Figura 7.22). Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de NCoA-2 aumenta el tiempo de residencia de GRmon/Dex en los sitios lentos (Figura 7.10).

La capacidad de GRmon de formar *foci* subnucleares en presencia de Dex se encuentra disminuida (Figura 6.4). Además, este mutante presenta un menor reclutamiento al arreglo MMTV (Figura 7.16), aunque su interacción con el arreglo es similar a la del GR (Figura 7.21).

Este mutante presenta una movilidad mucho mayor que la versión salvaje, tanto en ausencia como en presencia de Dex (Figuras 7.7 y 7.8). Esto implica que, pese a que GRmon tiene cierta capacidad de unirse a, por ejemplo, sitios pre-programados en la cromatina [169], su capacidad de unión al ADN está fuertemente alterada. Tal es así que la dinámica de GRmon/Dex resulta bastante similar a la del GR inactivo (Figura 7.7). Su capacidad altamente disminuida de unirse a la cromatina podría explicar su deficiencia en el reclutamiento al arreglo MMTV y su incapacidad de inducir la expresión génica (Figura 7.22). Sin embargo, su capacidad de transrepresión es similar a la del receptor salvaje [169], por lo que quizá esta función no requiera la unión directa o indirecta del receptor.

9.6. Análisis de las propiedades de distintas conformaciones del GR

Como se explicó previamente, la concepción del modelo disociado para explicar el mecanismo de acción del GR se basó en la correlación de propiedades estructurales y funcionales a nivel molecular y celular del receptor con los efectos biológicos de los GC. De esta manera, se asoció el estado dimérico del receptor con su capacidad de inducir la expresión de genes responsables de los efectos adversos de los GC, mientras que el estado monomérico del GR se relacionó con su capacidad de reprimir la expresión de genes pro-inflamatorios.

Múltiples evidencias demuestran que el mecanismo de acción es más complejo que lo que se creía. Como afirman Clark y Belvisi [248]: *“Desde una perspectiva evolutiva, parece improbable que podamos descubrir una división directa en mecanismos entre un modo de acción del GR que es deseable terapéuticamente y otros que son menos útiles para el paciente y para el médico”*.

Actualmente, se considera que el GR puede adquirir distintas conformaciones de acuerdo a diversas variables (ligando unido, interacción con otros TF, correguladores y el ADN, modificaciones postraduccionales), y que su conformación determina el tipo de respuesta transcripcional que puede ejercer en un determinado contexto celular, de acuerdo a la expresión y disponibilidad de correguladores de la transcripción, la actividad de otros TF y el estado de la cromatina en sus genes *blanco* [217].

En este sentido, en este trabajo de Tesis se utilizaron mutantes del receptor o distintos ligandos como herramientas para estudiar distintas conformaciones posibles del GR. En la Tabla 9.1, se resumen las características de estas conformaciones del GR, compiladas a partir de los resultados de esta Tesis y datos de bibliografía. Aquellas propiedades similares a las del GR inactivo, sin ligando, se representan en rojo, mientras que aquellas similares a las de GR/Dex se representan en verde.

Receptor/Ligando		GR	GR Dex	GR 21-OH	GRdim Dex	GRmon Dex
Actividad transcripcional	Transactivación [169, 270]	No	Alta	No	No	No
	Transrepresión [169, 270]	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Estado de oligomerización [169]		Monómero	Dímero	Dímero	Dímero	Monómero
Distribución espacial	Distribución subcelular	Citoplasma	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Núcleo
	Formación de <i>foci</i> nucleares	Muy baja	Alta	Baja	Alta	Baja
Interacción con NCoA-2	Global en el núcleo (FCCS)	Muy baja	Alta	Baja	Alta	Baja
	Redistribución de NCoA-2 desde cuerpos PML	No	Sí	No	Sí	No
	Unión a sitios lentos (con vs. sin NCoA-2)	Igual	Mayor	Igual	Mayor	Mayor
	Unión a sitios rápidos (con vs. sin NCoA-2)	Menor	Igual	Menor	Menor	Menor
	Coactivación transcripcional por NCoA-2	No	Sí	No	Sí	No
Movilidad intranuclear		Rápida	Lenta	Lenta	Lenta	Rápida
Interacción con arreglo de GRE	Reclutamiento	-	Muy alto	Muy bajo	Alto	Bajo
	Dinámica	-	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s

Tabla 9.1. Propiedades biológicas de GR sin ligando, GR unido a Dex o a 21-OH y mutantes GRdim y GRmon unidos a Dex. Las celdas según sus propiedades sean similares a las del GR inactivo, sin ligando (rojo) o a las del GR activo, unido a Dex (verde).

La Tabla 9.1 muestra que no es posible establecer una correlación total entre las propiedades analizadas y la respuesta transcripcional del receptor. Con respecto al estado de oligomerización, se ha observado que la transrepresión puede ser ejercida tanto por GR dimérico como monomérico, y que la dimerización no implica necesariamente una capacidad de transactivación [169]. Estas observaciones son compatibles sin embargo con que la dimerización del GR sea un requisito necesario aunque no suficiente en la vía de transactivación. De hecho, se ha comprobado que el GR se encuentra formando un tetrámero en sus sitios blanco en el ADN [167].

Hay ciertas características compartidas entre las condiciones en las que está afectada la capacidad del receptor de inducir la expresión génica. Constituye una excepción el caso de GRdim/Dex, que conserva muchas propiedades similares a las de GR/Dex (Tabla 9.1), pero posee menor capacidad de transactivación.

En cuanto a su distribución espacial, tanto GR sin ligando, como GR/21-OH y GRmon/Dex forman una menor densidad de *foci* subnucleares (Figura 6.4) y son incapaces de redistribuir a NCoA-2 desde sus cuerpos PML (Figura 6.6). Estos dos aspectos de la distribución espacial parecen correlacionar entre sí, ya que GR/Dex y GRdim/Dex forman una alta cantidad de *foci* (Figura 6.4) a la vez que promueven la redistribución de NCoA-2 justamente a estos *foci* (Figura 6.5 y 6.6). Este fenómeno podría explicarse bajo la hipótesis de que los *foci* funcionan como reservorios que por ley de acción de masas contribuyen a desplazar los equilibrios, traccionando a los complejos GR:NCoA-2 fuera de los cuerpos PML. Es decir, la formación de *foci* sería un requisito para una adecuada redistribución del coactivador desde los cuerpos PML. Dado que el GR forma *foci per se*, la liberación de NCoA-2 desde los PML no sería necesaria para este proceso.

Es preciso notar que la distribución subcelular entre citoplasma y núcleo no basta para distinguir si el receptor se encuentra activo o inactivo (Tabla 9.1). Mientras que GR sin ligando se encuentra mayoritariamente en citoplasma, en las otras cuatro condiciones estudiadas el receptor se encuentra preferentemente en el núcleo. Sin embargo, aun en el núcleo, GRmon/Dex presenta una unión a la cromatina tan pobre como GR sin ligando (Figura 7.7) y es incapaz, al igual que GRdim/Dex y GR/21-OH, de inducir la expresión génica [169, 270].

Si bien la incapacidad de redistribución de NCoA-2 por parte de algunas conformaciones de GR se encuentra asociada a una menor formación de *foci* (Tabla 9.1), otra

explicación a esta incapacidad podría ser una deficiencia en la interacción entre el coactivador y el receptor (Tabla 9.1). De hecho, tanto GR sin ligando como GR/21-OH y GRmon/Dex no pueden redistribuir NCoA-2 de los cuerpos PML ni interactuar con este coactivador como sí lo pueden hacer GR/Dex y GRdim/Dex (Figuras 6.4 y 6.5). Esta interacción se analizó ya sea directamente por FCCS en el nucleoplasma a través del cálculo de una constante de asociación (Figura 7.14), como de forma indirecta, analizando el efecto de la sobreexpresión de NCoA-2 sobre la movilidad del receptor (Figura 7.10) o sobre su actividad transcripcional en ensayos de gen reportero (Figura 7.22). La sobreexpresión de NCoA-2 promovió la unión de GR/Dex y de GRdim/Dex a sitios lentos de la cromatina (Figura 7.10), y provocó un aumento en su actividad transcripcional. Por el contrario, la sobreexpresión de NCoA-2 no indujo la actividad transcripcional de GR, GR/21-OH ni GRmon/Dex (Figura 7.22)[270], y no incrementó la unión de GR y GR/21-OH a sitios lentos de la cromatina (Figura 7.10). La observación de un aumento del tiempo de residencia de GRmon/Dex en presencia de NCoA-2 (Figura 7.10) resulta contradictoria en el marco del conjunto de los resultados.

Una característica llamativa de las conformaciones con actividad transcripcional deficiente (GR, GR/21-OH, GRdim/Dex y GRmon/Dex) es que la sobreexpresión de NCoA-2 promueve una disminución de la fracción del receptor unida a los sitios rápidos (Figura 7.10). Dado que la fracción unida a sitios lentos se mantiene, esto implica un aumento en la fracción difusiva. Este resultado es paradójico ya que con excepción de GRdim/Dex estas conformaciones del receptor interactúan en menor medida con el coactivador (Figura 7.14) y la expresión de NCoA-2 no tiene efecto sobre la actividad transcripcional de estas variantes (Figura 7.22). Cabe preguntarse por un lado de qué manera el coactivador es capaz de ejercer este efecto sobre la dinámica del receptor si la interacción entre ellos es baja y por otro lado si esta redistribución tiene alguna relevancia biológica.

Con respecto a la dinámica intranuclear medida por FCS de punto único en el nucleoplasma, no existe una correlación directa entre la movilidad del GR y su actividad transcripcional (Tabla 9.2). La activación del GR por unión de Dex produce un retardo en la movilidad del receptor debido a un incremento en la unión a sitios lentos de la cromatina (Figura 7.4). En concordancia con este resultado, la movilidad de GRmon/Dex, que tiene afectada su unión al ADN y su capacidad de inducción génica, es alta como la del GR inactivo, sin ligando (Figura 7.7). Sin embargo, GR/21-OH (Figura 7.5) y GRdim/Dex (Figura 7.6) presentan una movilidad intranuclear similar a la de GR/Dex, por lo cual no es posible establecer una correlación. Este fenómeno lleva a discutir nuevamente qué representan los

sitios lentos y rápidos detectados en este tipo de experimentos. Como se discutió previamente, estos sitios pueden ser biológicamente relevantes pero no necesariamente secuencias GRE. Se debe destacar además que los tiempos de residencia obtenidos representan el comportamiento promedio de una población con una variedad de especificidad de unión para el GR. Además, debe tenerse en cuenta que el receptor es capaz de unirse indirectamente al ADN a través de otros factores de transcripción y regular la transcripción por transrepresión [412].

Por último, los experimentos sobre el arreglo de sitios GRE arrojaron resultados inesperados. Por un lado, se observó un menor reclutamiento de GR/21-OH y GRmon/Dex al arreglo (Figura 7.16), en concordancia con su incapacidad para inducir genes bajo el control del promotor MMTV. Sin embargo, GRdim/Dex presentó un reclutamiento al arreglo similar a GR/Dex. Todas las variantes estudiadas (GR/Dex, GRmon/Dex, GRdim/Dex y GR/21-OH) presentaron una dinámica similar en los sitios de unión pero distinta capacidad de ser reclutadas (Figura 7.21). Por ejemplo, en el caso de células tratadas con 21-OH el arreglo se detectó en ~10% de las células. Esto implica que los resultados de dinámica representan a la subpoblación de células que presentan un cierto reclutamiento del receptor en el arreglo. Estos resultados indican que el reclutamiento del receptor a los GRE puede ser muy relevante en su actividad, y este reclutamiento puede ser influido por los distintos aspectos de la dinámica y la distribución intranucleares estudiados en esta Tesis.

10. Conclusiones finales

La organización nuclear de un factor de transcripción comprende su distribución espacial, sus interacciones con diferentes subcompartimentos o reservorios nucleares y la dinámica temporal que rige estos procesos. El receptor de glucocorticoides presenta una organización nuclear compleja y dinámica, la cual se encuentra relacionada con su modo de acción.

En células no estimuladas, el GR se encuentra principalmente en el citoplasma y el coactivador NCoA-2 se acumula en cuerpos nucleares PML. La activación del receptor por unión de un agonista como la dexametasona induce su translocación al núcleo, la formación de heterocomplejos GR:NCoA-2 y la redistribución de estas dos proteínas en múltiples *foci* subnucleares. Estos dominios focales dependen estructuralmente de la integridad del ADN y presentan un intercambio dinámico de GR y NCoA-2, que también interactúan en estos *foci*. La estimulación hormonal dispara el reclutamiento y la redistribución de GR e indirectamente de NCoA-2 entre numerosos sitios de unión en la cromatina, incluyendo sitios específicos e inespecíficos. El conjunto de las interacciones del GR con los distintos subcompartimentos nucleares se esquematiza en la Figura 10.

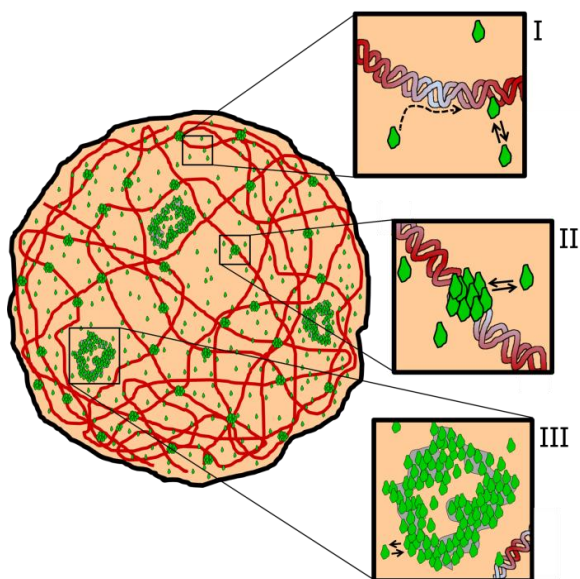


Figura 10. Modelo de la organización dinámica del GR en el núcleo. Se representa esquemáticamente la partición dinámica del GR (entidades verdes) en el *paísaje* de interacciones intranucleares. La cromatina se representa como cintas rojas. Las moléculas del GR difunden en el nucleoplasma y pueden interactuar con sitios en la cromatina con distintos tiempos de residencia (I), con foci dependientes de ADN (II) o con cuerpos PML (III).

El tipo de ligando unido y mutaciones en el GR definen conformaciones del receptor con diferente actividad transcripcional. El análisis de otras conformaciones del GR muestra que la distribución espacial, la interacción con NCoA-2 y la dinámica intranuclear están comprometidas en el GR unido a 21-OH o en el mutante GRmon, en comparación al GR completamente activo. En este sentido, estos aspectos de la organización nuclear podrían explicar, parcialmente, la incapacidad de estas conformaciones de inducir la expresión génica.

Como se desarrolló en esta Tesis, la partición dinámica de los TF en diferentes reservorios nucleares constituye un mecanismo regulatorio que impactaría en su función biológica. El enfoque clásico del TF interactuando *in vitro* con su secuencia *blanco* implica no tener en cuenta todas las interacciones que ocurren en el núcleo de células vivas. El conjunto de estas interacciones define la disponibilidad local del TF y, en última instancia, las posibilidades de interactuar con secuencias *blanco* y regular la expresión génica.

11. Referencias

- [1] B. Cautain, R. Hill, N. de Pedro, W. Link, Components and regulation of nuclear transport processes, *FEBS J* 282(3) (2015) 445-62.
- [2] T. Misteli, Beyond the sequence: cellular organization of genome function, *Cell* 128(4) (2007) 787-800.
- [3] T. Misteli, Concepts in nuclear architecture, *Bioessays* 27(5) (2005) 477-87.
- [4] A. Papantonis, P.R. Cook, Transcription factories: genome organization and gene regulation, *Chem Rev* 113(11) (2013) 8683-705.
- [5] G. Cavalli, T. Misteli, Functional implications of genome topology, *Nat Struct Mol Biol* 20(3) (2013) 290-9.
- [6] G. Bohmdorfer, A.T. Wierzbicki, Control of Chromatin Structure by Long Noncoding RNA, *Trends in cell biology* 25(10) (2015) 623-32.
- [7] T. Mondal, M. Rasmussen, G.K. Pandey, A. Isaksson, C. Kanduri, Characterization of the RNA content of chromatin, *Genome research* 20(7) (2010) 899-907.
- [8] R.K. McGinty, S. Tan, Nucleosome structure and function, *Chem Rev* 115(6) (2015) 2255-73.
- [9] M.R. Hubner, M.A. Eckersley-Maslin, D.L. Spector, Chromatin organization and transcriptional regulation, *Current opinion in genetics & development* 23(2) (2013) 89-95.
- [10] C.A. Davey, D.F. Sargent, K. Luger, A.W. Maeder, T.J. Richmond, Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution, *Journal of molecular biology* 319(5) (2002) 1097-113.
- [11] A.L. Olins, D.E. Olins, Spheroid chromatin units (v bodies), *Science* 183(4122) (1974) 330-2.
- [12] D.E. Olins, A.L. Olins, Chromatin history: our view from the bridge, *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(10) (2003) 809-14.
- [13] J.B. Hardin, G.P., *Becker's World of the Cell*, 9th ed., Pearson Education 2015.
- [14] V.A. Bloomfield, DNA condensation, *Current opinion in structural biology* 6(3) (1996) 334-41.
- [15] K. Maeshima, R. Imai, S. Tamura, T. Nozaki, Chromatin as dynamic 10-nm fibers, *Chromosoma* 123(3) (2014) 225-37.
- [16] W.K.M. Lai, B.F. Pugh, Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication, *Nature reviews. Molecular cell biology* 18(9) (2017) 548-562.
- [17] G.J. Narlikar, R. Sundaramoorthy, T. Owen-Hughes, Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes, *Cell* 154(3) (2013) 490-503.
- [18] H.S. Rhee, A.R. Bataille, L. Zhang, B.F. Pugh, Subnucleosomal structures and nucleosome asymmetry across a genome, *Cell* 159(6) (2014) 1377-88.
- [19] B. Eslami-Mossallam, H. Schiessel, J. van Noort, Nucleosome dynamics: Sequence matters, *Advances in colloid and interface science* 232 (2016) 101-113.
- [20] C.W. Roberts, S.H. Orkin, The SWI/SNF complex--chromatin and cancer, *Nat Rev Cancer* 4(2) (2004) 133-42.
- [21] P.D. Hartley, H.D. Madhani, Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity, *Cell* 137(3) (2009) 445-58.
- [22] C.G. Marfella, A.N. Imbalzano, The Chd family of chromatin remodelers, *Mutation research* 618(1-2) (2007) 30-40.
- [23] D.F. Corona, J.W. Tamkun, Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication, *Biochimica et biophysica acta* 1677(1-3) (2004) 113-9.
- [24] C.M. Weber, S. Henikoff, Histone variants: dynamic punctuation in transcription, *Genes & development* 28(7) (2014) 672-82.
- [25] M. Brunelle, A. Nordell Markovits, S. Rodrigue, M. Lupien, P.E. Jacques, N. Gevry, The histone variant H2A.Z is an important regulator of enhancer activity, *Nucleic acids research* 43(20) (2015) 9742-56.
- [26] G.D. Bowman, M.G. Poirier, Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics, *Chem Rev* 115(6) (2015) 2274-95.
- [27] B.D. Strahl, C.D. Allis, The language of covalent histone modifications, *Nature* 403(6765) (2000) 41-5.

- [28] J.T. Finch, A. Klug, Solenoidal model for superstructure in chromatin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(6) (1976) 1897-901.
- [29] P.J. Robinson, L. Fairall, V.A. Huynh, D. Rhodes, EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(17) (2006) 6506-11.
- [30] T. Schalch, S. Duda, D.F. Sargent, T.J. Richmond, X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre, *Nature* 436(7047) (2005) 138-41.
- [31] C.L. Woodcock, Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length, *The Journal of cell biology* 125(1) (1994) 11-9.
- [32] C. Lanctot, T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli, T. Cremer, Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions, *Nat Rev Genet* 8(2) (2007) 104-15.
- [33] T. Cremer, C. Cremer, Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells, *Nat Rev Genet* 2(4) (2001) 292-301.
- [34] M.R. Branco, A. Pombo, Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations, *PLoS biology* 4(5) (2006) e138.
- [35] E. Meshorer, D. Yellajoshula, E. George, P.J. Scambler, D.T. Brown, T. Misteli, Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells, *Dev Cell* 10(1) (2006) 105-16.
- [36] R.J. O'Sullivan, J. Karlseder, The great unravelling: chromatin as a modulator of the aging process, *Trends Biochem Sci* 37(11) (2012) 466-76.
- [37] J.R. Dixon, S. Selvaraj, F. Yue, A. Kim, Y. Li, Y. Shen, M. Hu, J.S. Liu, B. Ren, Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions, *Nature* 485(7398) (2012) 376-80.
- [38] T. Sexton, E. Yaffe, E. Kenigsberg, F. Bantignies, B. Leblanc, M. Hoichman, H. Parrinello, A. Tanay, G. Cavalli, Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome, *Cell* 148(3) (2012) 458-72.
- [39] S.S. Rao, M.H. Huntley, N.C. Durand, E.K. Stamenova, I.D. Bochkov, J.T. Robinson, A.L. Sanborn, I. Machol, A.D. Omer, E.S. Lander, E.L. Aiden, A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping, *Cell* 159(7) (2014) 1665-80.
- [40] B.A. Bouwman, W. de Laat, Getting the genome in shape: the formation of loops, domains and compartments, *Genome Biol* 16 (2015) 154.
- [41] H. Strickfaden, A. Zunhammer, S. van Koningsbruggen, D. Kohler, T. Cremer, 4D chromatin dynamics in cycling cells: Theodor Boveri's hypotheses revisited, *Nucleus* 1(3) (2010) 284-97.
- [42] O. Symmons, V.V. Uslu, T. Tsujimura, S. Ruf, S. Nassari, W. Schwarzer, L. Ettwiller, F. Spitz, Functional and topological characteristics of mammalian regulatory domains, *Genome research* 24(3) (2014) 390-400.
- [43] K. Van Bortle, M.H. Nichols, L. Li, C.T. Ong, N. Takenaka, Z.S. Qin, V.G. Corces, Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy, *Genome Biol* 15(6) (2014) R82.
- [44] L.S. Shopland, C.R. Lynch, K.A. Peterson, K. Thornton, N. Kepper, J. Hase, S. Stein, S. Vincent, K.R. Molloy, G. Kreth, C. Cremer, C.J. Bult, T.P. O'Brien, Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence, *The Journal of cell biology* 174(1) (2006) 27-38.
- [45] A.M. Boutanaev, L.M. Mikhaylova, D.I. Nurminsky, The pattern of chromosome folding in interphase is outlined by the linear gene density profile, *Molecular and cellular biology* 25(18) (2005) 8379-86.
- [46] E.V. Volpi, E. Chevret, T. Jones, R. Vatcheva, J. Williamson, S. Beck, R.D. Campbell, M. Goldsworthy, S.H. Powis, J. Ragoussis, J. Trowsdale, D. Sheer, Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei, *Journal of cell science* 113 (Pt 9) (2000) 1565-76.
- [47] R.R. Williams, S. Broad, D. Sheer, J. Ragoussis, Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei, *Exp Cell Res* 272(2) (2002) 163-75.
- [48] L. Guelen, L. Pagie, E. Brasset, W. Meuleman, M.B. Faza, W. Talhout, B.H. Eussen, A. de Klein, L. Wessels, W. de Laat, B. van Steensel, Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions, *Nature* 453(7197) (2008) 948-51.
- [49] R.I. Kumaran, D.L. Spector, A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence, *The Journal of cell biology* 180(1) (2008) 51-65.

- [50] P.J. Wijchers, G. Geeven, M. Eyres, A.J. Bergsma, M. Janssen, M. Verstegen, Y. Zhu, Y. Schell, C. Vermeulen, E. de Wit, W. de Laat, Characterization and dynamics of pericentromere-associated domains in mice, *Genome research* 25(7) (2015) 958-69.
- [51] M. Lundgren, C.M. Chow, P. Sabbattini, A. Georgiou, S. Minaee, N. Dillon, Transcription factor dosage affects changes in higher order chromatin structure associated with activation of a heterochromatic gene, *Cell* 103(5) (2000) 733-43.
- [52] T. Cremer, M. Cremer, B. Hubner, H. Strickfaden, D. Smeets, J. Popken, M. Sterr, Y. Markaki, K. Rippe, C. Cremer, The 4D nucleome: Evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and inactive nuclear compartments, *FEBS letters* 589(20 Pt A) (2015) 2931-43.
- [53] M. Dunder, T. Misteli, Biogenesis of nuclear bodies, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12) (2010) a000711.
- [54] M.D. Hebert, A.G. Matera, Self-association of coilin reveals a common theme in nuclear body localization, *Mol Biol Cell* 11(12) (2000) 4159-71.
- [55] R. Morse, D.J. Shaw, A.G. Todd, P.J. Young, Targeting of SMN to Cajal bodies is mediated by self-association, *Hum Mol Genet* 16(19) (2007) 2349-58.
- [56] A. Kentsis, R.E. Gordon, K.L. Borden, Control of biochemical reactions through supramolecular RING domain self-assembly, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24) (2002) 15404-9.
- [57] Y.S. Mao, B. Zhang, D.L. Spector, Biogenesis and function of nuclear bodies, *Trends Genet* 27(8) (2011) 295-306.
- [58] M. Dunder, T. Misteli, Functional architecture in the cell nucleus, *Biochem J* 356(Pt 2) (2001) 297-310.
- [59] K.E. Handwerger, J.G. Gall, Subnuclear organelles: new insights into form and function, *Trends Cell Biol* 16(1) (2006) 19-26.
- [60] D. Hernandez-Verdun, The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions, *Histochem Cell Biol* 126(2) (2006) 135-48.
- [61] R. Bernardi, P.P. Pandolfi, Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12) (2007) 1006-16.
- [62] S.M. Hearst, A.S. Gilder, S.S. Negi, M.D. Davis, E.M. George, A.A. Whittom, C.G. Toyota, A. Husedzinovic, O.J. Gruss, M.D. Hebert, Cajal-body formation correlates with differential coilin phosphorylation in primary and transformed cell lines, *J Cell Sci* 122(Pt 11) (2009) 1872-81.
- [63] J.E. Sleeman, L. Trinkle-Mulcahy, Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance, *Curr Opin Cell Biol* 28 (2014) 76-83.
- [64] K.B. Shpargel, J.K. Ospina, K.E. Tucker, A.G. Matera, M.D. Hebert, Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus, *J Cell Sci* 116(Pt 2) (2003) 303-12.
- [65] T. Misteli, Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function, *J Cell Sci* 113 (Pt 11) (2000) 1841-9.
- [66] M.O. Olson, M. Dunder, A. Szebeni, The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities, *Trends Cell Biol* 10(5) (2000) 189-96.
- [67] D. Stanek, K.M. Neugebauer, Detection of snRNP assembly intermediates in Cajal bodies by fluorescence resonance energy transfer, *J Cell Biol* 166(7) (2004) 1015-25.
- [68] C. Verheggen, D.L. Lafontaine, D. Samarsky, J. Mouaikel, J.M. Blanchard, R. Bordonne, E. Bertrand, Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments, *EMBO J* 21(11) (2002) 2736-45.
- [69] F.M. Boisvert, M.J. Hendzel, D.P. Bazett-Jones, Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA, *J Cell Biol* 148(2) (2000) 283-92.
- [70] K. Weis, S. Rambaud, C. Lavau, J. Jansen, T. Carvalho, M. Carmo-Fonseca, A. Lamond, A. Dejean, Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells, *Cell* 76(2) (1994) 345-56.
- [71] J.J. Luciani, D. Depetris, Y. Usson, C. Metzler-Guillemain, C. Mignon-Ravix, M.J. Mitchell, A. Megarbane, P. Sarda, H. Sirma, A. Moncla, J. Feunteun, M.G. Mattei, PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase, *J Cell Sci* 119(Pt 12) (2006) 2518-31.
- [72] T.R. Yeager, A.A. Neumann, A. Englezou, L.I. Huschtscha, J.R. Noble, R.R. Reddel, Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body, *Cancer Res* 59(17) (1999) 4175-9.
- [73] V. Lallemand-Breitenbach, H. de The, PML nuclear bodies, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(5) (2010) a000661.

- [74] P. Brand, T. Lenser, P. Hemmerich, Assembly dynamics of PML nuclear bodies in living cells, *PMC Biophys* 3(1) (2010) 3.
- [75] M. Lang, T. Jegou, I. Chung, K. Richter, S. Munch, A. Udvarhelyi, C. Cremer, P. Hemmerich, J. Engelhardt, S.W. Hell, K. Rippe, Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies, *J Cell Sci* 123(Pt 3) (2010) 392-400.
- [76] E. de Stanchina, E. Querido, M. Narita, R.V. Davuluri, P.P. Pandolfi, G. Ferbeyre, S.W. Lowe, PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions, *Mol Cell* 13(4) (2004) 523-35.
- [77] D.Y. Lin, M.Z. Lai, D.K. Ann, H.M. Shih, Promyelocytic leukemia protein (PML) functions as a glucocorticoid receptor co-activator by sequestering Daxx to the PML oncogenic domains (PODs) to enhance its transactivation potential, *J Biol Chem* 278(18) (2003) 15958-65.
- [78] J.R. St-Germain, J. Chen, Q. Li, Involvement of PML nuclear bodies in CBP degradation through the ubiquitin-proteasome pathway, *Epigenetics* 3(6) (2008) 342-9.
- [79] R. Carter, G. Drouin, The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA polymerase III relative to RNA polymerase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors, *Molecular biology and evolution* 27(5) (2010) 1035-43.
- [80] J. Russell, J.C. Zomerdijs, RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works, *Trends Biochem Sci* 30(2) (2005) 87-96.
- [81] G. Dieci, G. Fiorino, M. Castelnuovo, M. Teichmann, A. Pagano, The expanding RNA polymerase III transcriptome, *Trends Genet* 23(12) (2007) 614-22.
- [82] G.W. Jawdekar, R.W. Henry, Transcriptional regulation of human small nuclear RNA genes, *Biochimica et biophysica acta* 1779(5) (2008) 295-305.
- [83] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek, V.N. Kim, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *The EMBO journal* 23(20) (2004) 4051-60.
- [84] S. Hahn, Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery, *Nature structural & molecular biology* 11(5) (2004) 394-403.
- [85] S.T. Smale, J.T. Kadonaga, The RNA polymerase II core promoter, *Annu Rev Biochem* 72 (2003) 449-79.
- [86] B.L. Allen, D.J. Taatjes, The Mediator complex: a central integrator of transcription, *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(3) (2015) 155-66.
- [87] Y. Ohkuma, Multiple functions of general transcription factors TFIIE and TFIIH in transcription: possible points of regulation by trans-acting factors, *Journal of biochemistry* 122(3) (1997) 481-9.
- [88] B.F. Pugh, Mechanisms of transcription complex assembly, *Current opinion in cell biology* 8(3) (1996) 303-11.
- [89] H. Chen, D.R. Larson, What have single-molecule studies taught us about gene expression?, *Genes & development* 30(16) (2016) 1796-810.
- [90] L.J. Friedman, J. Gelles, Mechanism of transcription initiation at an activator-dependent promoter defined by single-molecule observation, *Cell* 148(4) (2012) 679-89.
- [91] T.J. Stasevich, J.G. McNally, Assembly of the transcription machinery: ordered and stable, random and dynamic, or both?, *Chromosoma* 120(6) (2011) 533-45.
- [92] D. Rieder, Z. Trajanoski, J.G. McNally, Transcription factories, *Front Genet* 3 (2012) 221.
- [93] P.C. McKeown, P.J. Shaw, Chromatin: linking structure and function in the nucleolus, *Chromosoma* 118(1) (2009) 11-23.
- [94] C.E. Lyon, A.I. Lamond, The nucleolus, *Curr Biol* 10(9) (2000) R323.
- [95] P. Hozak, P.R. Cook, C. Schofer, W. Mosgoller, F. Wachtler, Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells, *J Cell Sci* 107 (Pt 2) (1994) 639-48.
- [96] D.A. Jackson, A.B. Hassan, R.J. Errington, P.R. Cook, Visualization of focal sites of transcription within human nuclei, *EMBO J* 12(3) (1993) 1059-65.
- [97] D.G. Wansink, W. Schul, I. van der Kraan, B. van Steensel, R. van Driel, L. de Jong, Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus, *J Cell Biol* 122(2) (1993) 283-93.
- [98] A. Pombo, D.A. Jackson, M. Hollinshead, Z. Wang, R.G. Roeder, P.R. Cook, Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III, *EMBO J* 18(8) (1999) 2241-53.
- [99] I. Faro-Trindade, P.R. Cook, Transcription factories: structures conserved during differentiation and evolution, *Biochem Soc Trans* 34(Pt 6) (2006) 1133-7.

- [100] I. Faro-Trindade, P.R. Cook, A conserved organization of transcription during embryonic stem cell differentiation and in cells with high C value, *Mol Biol Cell* 17(7) (2006) 2910-20.
- [101] A. Pombo, M. Hollinshead, P.R. Cook, Bridging the resolution gap: Imaging the same transcription factories in cryosections by light and electron microscopy, *J Histochem Cytochem* 47(4) (1999) 471-80.
- [102] P.R. Cook, A model for all genomes: the role of transcription factories, *J Mol Biol* 395(1) (2010) 1-10.
- [103] A. Papantonis, J.D. Larkin, Y. Wada, Y. Ohta, S. Ihara, T. Kodama, P.R. Cook, Active RNA polymerases: mobile or immobile molecular machines?, *PLoS Biol* 8(7) (2010) e1000419.
- [104] W.K. Cho, N. Jayanth, B.P. English, T. Inoue, J.O. Andrews, W. Conway, J.B. Grimm, J.H. Spille, L.D. Lavis, T. Lionnet, Cisse, II, RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells, *Elife* 5 (2016).
- [105] G.A. Maston, S.K. Evans, M.R. Green, Transcriptional regulatory elements in the human genome, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7 (2006) 29-59.
- [106] F. Claessens, D.T. Gewirth, DNA recognition by nuclear receptors, *Essays Biochem* 40 (2004) 59-72.
- [107] M.F.P. Carey, C.L. Smale, S.T., Transcriptional regulation in eukaryotes: concepts, strategies, and techniques, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000).
- [108] C.O. Pabo, R.T. Sauer, Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition, *Annu Rev Biochem* 61 (1992) 1053-95.
- [109] C. Geserick, H.A. Meyer, B. Haendler, The role of DNA response elements as allosteric modulators of steroid receptor function, *Mol Cell Endocrinol* 236(1-2) (2005) 1-7.
- [110] T.H. Leung, A. Hoffmann, D. Baltimore, One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers, *Cell* 118(4) (2004) 453-64.
- [111] L.A. Lettice, S.J. Heaney, L.A. Purdie, L. Li, P. de Beer, B.A. Oostra, D. Goode, G. Elgar, R.E. Hill, E. de Graaff, A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly, *Human molecular genetics* 12(14) (2003) 1725-35.
- [112] E.M. Blackwood, J.T. Kadonaga, Going the distance: a current view of enhancer action, *Science* 281(5373) (1998) 60-3.
- [113] J.M. Vilar, L. Saiz, DNA looping in gene regulation: from the assembly of macromolecular complexes to the control of transcriptional noise, *Current opinion in genetics & development* 15(2) (2005) 136-44.
- [114] A. Remenyi, H.R. Scholer, M. Wilmanns, Combinatorial control of gene expression, *Nature structural & molecular biology* 11(9) (2004) 812-5.
- [115] M.L. Atchison, Enhancers: mechanisms of action and cell specificity, *Annu Rev Cell Biol* 4 (1988) 127-53.
- [116] M.L. Privalsky, The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors, *Annual review of physiology* 66 (2004) 315-60.
- [117] L. Li, S. He, J.M. Sun, J.R. Davie, Gene regulation by Sp1 and Sp3, *Biochem Cell Biol* 82(4) (2004) 460-71.
- [118] M.B. Harris, J. Mosteck, P.B. Rothman, Repression of an interleukin-4-responsive promoter requires cooperative BCL-6 function, *The Journal of biological chemistry* 280(13) (2005) 13114-21.
- [119] L. Srinivasan, M.L. Atchison, YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP, *Genes & development* 18(21) (2004) 2596-601.
- [120] L. Chen, J. Widom, Mechanism of transcriptional silencing in yeast, *Cell* 120(1) (2005) 37-48.
- [121] B. Lemon, R. Tjian, Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control, *Genes & development* 14(20) (2000) 2551-69.
- [122] M. Ptashne, A. Gann, Transcriptional activation by recruitment, *Nature* 386(6625) (1997) 569-77.
- [123] M. Carey, Y.S. Lin, M.R. Green, M. Ptashne, A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by GAL4 derivatives, *Nature* 345(6273) (1990) 361-4.
- [124] Y.S. Lin, M. Carey, M. Ptashne, M.R. Green, How different eukaryotic transcriptional activators can cooperate promiscuously, *Nature* 345(6273) (1990) 359-61.
- [125] G. Orphanides, T. Lagrange, D. Reinberg, The general transcription factors of RNA polymerase II, *Genes & development* 10(21) (1996) 2657-83.
- [126] T.I. Lee, R.A. Young, Transcription of eukaryotic protein-coding genes, *Annu Rev Genet* 34 (2000) 77-137.

- [127] A.M. Naar, B.D. Lemon, R. Tjian, Transcriptional coactivator complexes, *Annual review of biochemistry* 70 (2001) 475-501.
- [128] I.L. de la Serna, Y. Ohkawa, C.A. Berkes, D.A. Bergstrom, C.S. Dacwag, S.J. Tapscott, A.N. Imbalzano, MyoD targets chromatin remodeling complexes to the myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex, *Molecular and cellular biology* 25(10) (2005) 3997-4009.
- [129] D.M. Lonard, B.W. O'Malley, Expanding functional diversity of the coactivators, *Trends Biochem Sci* 30(3) (2005) 126-32.
- [130] B.M. Spiegelman, R. Heinrich, Biological control through regulated transcriptional coactivators, *Cell* 119(2) (2004) 157-67.
- [131] J.T. Moore, J.L. Collins, K.H. Pearce, The nuclear receptor superfamily and drug discovery, *ChemMedChem* 1(5) (2006) 504-23.
- [132] J.W. Thornton, E. Need, D. Crews, Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling, *Science* 301(5640) (2003) 1714-7.
- [133] J.D. Ashwell, F.W. Lu, M.S. Vacchio, Glucocorticoids in T cell development and function*, *Annu Rev Immunol* 18 (2000) 309-45.
- [134] J.L. Arriza, C. Weinberger, G. Cerelli, T.M. Glaser, B.L. Handelin, D.E. Housman, R.M. Evans, Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor, *Science* 237(4812) (1987) 268-75.
- [135] G. Wambach, J.R. Higgins, D.C. Kem, W. Kaufmann, Interaction of synthetic progestagens with renal mineralocorticoid receptors, *Acta Endocrinol (Copenh)* 92(3) (1979) 560-7.
- [136] I.M. Spitz, C.W. Bardin, Mifepristone (RU 486)--a modulator of progestin and glucocorticoid action, *N Engl J Med* 329(6) (1993) 404-12.
- [137] M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot, *Cell* 83(6) (1995) 851-7.
- [138] D.M. Lonard, W. O'Malley B, Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation, *Mol Cell* 27(5) (2007) 691-700.
- [139] E.R. Simpson, M.R. Waterman, Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH, *Annu Rev Physiol* 50 (1988) 427-40.
- [140] M.T. Jones, B. Gillham, Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/beta-lipotrophic hormone, *Physiol Rev* 68(3) (1988) 743-818.
- [141] F. Holsboer, The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety, *J Psychiatr Res* 33(3) (1999) 181-214.
- [142] E.R. de Kloet, M. Joels, F. Holsboer, Stress and the brain: from adaptation to disease, *Nat Rev Neurosci* 6(6) (2005) 463-75.
- [143] A. McMaster, D.W. Ray, Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects, *Exp Physiol* 92(2) (2007) 299-309.
- [144] A. Kleiman, J.P. Tuckermann, Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice, *Mol Cell Endocrinol* 275(1-2) (2007) 98-108.
- [145] T. Chen, Nuclear receptor drug discovery, *Curr Opin Chem Biol* 12(4) (2008) 418-26.
- [146] T.J. Cole, Glucocorticoid action and the development of selective glucocorticoid receptor ligands, *Biotechnol Annu Rev* 12 (2006) 269-300.
- [147] A. Amsterdam, R. Sasson, The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis, *Mol Cell Endocrinol* 189(1-2) (2002) 1-9.
- [148] R.A. Overman, J.Y. Yeh, C.L. Deal, Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective, *Arthritis Care Res (Hoboken)* 65(2) (2013) 294-8.
- [149] J. Rosen, J.N. Miner, The search for safer glucocorticoid receptor ligands, *Endocr Rev* 26(3) (2005) 452-64.
- [150] H.J. Deeg, P.J. Henslee-Downey, Management of acute graft-versus-host disease, *Bone Marrow Transplant* 6(1) (1990) 1-8.
- [151] F. Buttgereit, G.R. Burmester, B.J. Lipworth, Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear, *Lancet* 365(9461) (2005) 801-3.
- [152] F. Ceccato, M. Boscaro, Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis, *High Blood Press Cardiovasc Prev* 23(3) (2016) 209-15.
- [153] L.K. Nieman, G.P. Chrousos, C. Kellner, I.M. Spitz, B.C. Nisula, G.B. Cutler, G.R. Merriam, C.W. Bardin, D.L. Loriaux, Successful treatment of Cushing's syndrome with the glucocorticoid antagonist RU 486, *J Clin Endocrinol Metab* 61(3) (1985) 536-40.

- [154] S. van der Laan, O.C. Meijer, Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors, *Eur J Pharmacol* 585(2-3) (2008) 483-91.
- [155] I.M. Beck, K. De Bosscher, G. Haegeman, Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research, *Trends Endocrinol Metab* 22(8) (2011) 295-310.
- [156] R. Kumar, E.B. Thompson, Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions, *Mol Endocrinol* 17(1) (2003) 1-10.
- [157] P.J. Godowski, S. Rusconi, R. Miesfeld, K.R. Yamamoto, Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement, *Nature* 325(6102) (1987) 365-8.
- [158] J. Ford, I.J. McEwan, A.P. Wright, J.A. Gustafsson, Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor in vitro, *Mol Endocrinol* 11(10) (1997) 1467-75.
- [159] A.J. Copik, M.S. Webb, A.L. Miller, Y. Wang, R. Kumar, E.B. Thompson, Activation function 1 of glucocorticoid receptor binds TATA-binding protein in vitro and in vivo, *Mol Endocrinol* 20(6) (2006) 1218-30.
- [160] J.A. Lefstin, K.R. Yamamoto, Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators, *Nature* 392(6679) (1998) 885-8.
- [161] Z. Wang, J. Frederick, M.J. Garabedian, Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo, *J Biol Chem* 277(29) (2002) 26573-80.
- [162] L.C. Watson, K.M. Kuchenbecker, B.J. Schiller, J.D. Gross, M.A. Pufall, K.R. Yamamoto, The glucocorticoid receptor dimer interface allosterically transmits sequence-specific DNA signals, *Nat Struct Mol Biol* 20(7) (2013) 876-83.
- [163] T. Hard, E. Kellenbach, R. Boelens, B.A. Maler, K. Dahlman, L.P. Freedman, J. Carlstedt-Duke, K.R. Yamamoto, J.A. Gustafsson, R. Kaptein, Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain, *Science* 249(4965) (1990) 157-60.
- [164] B.F. Luisi, W.X. Xu, Z. Otwinowski, L.P. Freedman, K.R. Yamamoto, P.B. Sigler, Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA, *Nature* 352(6335) (1991) 497-505.
- [165] M. Nishi, M. Tanaka, K. Matsuda, M. Sunaguchi, M. Kawata, Visualization of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor interactions in living cells with GFP-based fluorescence resonance energy transfer, *J Neurosci* 24(21) (2004) 4918-27.
- [166] S. Chen, J. Wang, G. Yu, W. Liu, D. Pearce, Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity, *The Journal of biological chemistry* 272(22) (1997) 14087-92.
- [167] D.M. Presman, S. Ganguly, R.L. Schiltz, T.A. Johnson, T.S. Karpova, G.L. Hager, DNA binding triggers tetramerization of the glucocorticoid receptor in live cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(29) (2016) 8236-41.
- [168] C. Helsen, S. Kerkhofs, L. Clinckemalie, L. Spans, M. Laurent, S. Boonen, D. Vanderschueren, F. Claessens, Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding, *Molecular and cellular endocrinology* 348(2) (2012) 411-7.
- [169] D.M. Presman, M.F. Ogara, M. Stortz, L.D. Alvarez, J.R. Pooley, R.L. Schiltz, L. Grontved, T.A. Johnson, P.R. Mittelstadt, J.D. Ashwell, S. Ganesan, G. Burton, V. Levi, G.L. Hager, A. Pecci, Live cell imaging unveils multiple domain requirements for in vivo dimerization of the glucocorticoid receptor, *PLoS Biol* 12(3) (2014) e1001813.
- [170] L.D. Alvarez, D.M. Presman, A. Pecci, Molecular dynamics simulations of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain suggest a role of the lever-arm mobility in transcriptional output, *PLoS One* 12(12) (2017) e0189588.
- [171] R.K. Bledsoe, V.G. Montana, T.B. Stanley, C.J. Delves, C.J. Apolito, D.D. McKee, T.G. Consler, D.J. Parks, E.L. Stewart, T.M. Willson, M.H. Lambert, J.T. Moore, K.H. Pearce, H.E. Xu, Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition, *Cell* 110(1) (2002) 93-105.
- [172] B. Kauppi, C. Jakob, M. Farnegardh, J. Yang, H. Ahola, M. Alarcon, K. Calles, O. Engstrom, J. Harlan, S. Muchmore, A.K. Ramqvist, S. Thorell, L. Ohman, J. Greer, J.A. Gustafsson, J. Carlstedt-Duke, M. Carlquist, The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism, *J Biol Chem* 278(25) (2003) 22748-54.
- [173] R.K. Bledsoe, E.L. Stewart, K.H. Pearce, Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain, *Vitam Horm* 68 (2004) 49-91.

- [174] L. Nagy, H.Y. Kao, J.D. Love, C. Li, E. Banayo, J.T. Gooch, V. Krishna, K. Chatterjee, R.M. Evans, J.W. Schwabe, Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors, *Genes Dev* 13(24) (1999) 3209-16.
- [175] R.M. Losel, E. Falkenstein, M. Feuring, A. Schultz, H.C. Tillmann, K. Rossol-Haseroth, M. Wehling, Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers, *Physiol Rev* 83(3) (2003) 965-1016.
- [176] A. Bruna, M. Nicolas, A. Munoz, J.M. Kyriakis, C. Caelles, Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids, *Embo J* 22(22) (2003) 6035-44.
- [177] M. Lowenberg, A.P. Verhaar, G.R. van den Brink, D.W. Hommes, Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression, *Trends Mol Med* 13(4) (2007) 158-63.
- [178] D.B. Defranco, A.P. Madan, Y. Tang, U.R. Chandran, N. Xiao, J. Yang, Nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors, *Vitam Horm* 51 (1995) 315-38.
- [179] E.H. Bresnick, F.C. Dalman, E.R. Sanchez, W.B. Pratt, Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor, *J Biol Chem* 264(9) (1989) 4992-7.
- [180] W.B. Pratt, M.D. Galigniana, Y. Morishima, P.J. Murphy, Role of molecular chaperones in steroid receptor action, *Essays Biochem* 40 (2004) 41-58.
- [181] W.B. Pratt, M.D. Galigniana, J.M. Harrell, D.B. DeFranco, Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement, *Cell Signal* 16(8) (2004) 857-72.
- [182] B.M. Necela, J.A. Cidlowski, Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells, *Proc Am Thorac Soc* 1(3) (2004) 239-46.
- [183] C.L. Storer, C.A. Dickey, M.D. Galigniana, T. Rein, M.B. Cox, FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22(12) (2011) 481-90.
- [184] M.D. Galigniana, C. Radanyi, J.M. Renoir, P.R. Housley, W.B. Pratt, Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus, *J Biol Chem* 276(18) (2001) 14884-9.
- [185] M.D. Galigniana, J.M. Harrell, P.J. Murphy, M. Chinkers, C. Radanyi, J.M. Renoir, M. Zhang, W.B. Pratt, Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain, *Biochemistry* 41(46) (2002) 13602-10.
- [186] T.H. Davies, Y.M. Ning, E.R. Sanchez, A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins, *J Biol Chem* 277(7) (2002) 4597-600.
- [187] M.J. Czar, R.H. Lyons, M.J. Welsh, J.M. Renoir, W.B. Pratt, Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus, *Mol Endocrinol* 9(11) (1995) 1549-60.
- [188] S. Vandevyver, L. Dejager, J. Tuckermann, C. Libert, New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation, *Endocrinology* 154(3) (2013) 993-1007.
- [189] T.N. Collingwood, F.D. Urnov, A.P. Wolffe, Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription, *J Mol Endocrinol* 23(3) (1999) 255-75.
- [190] M.J. Schaaf, J.A. Cidlowski, Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance, *J Steroid Biochem Mol Biol* 83(1-5) (2002) 37-48.
- [191] B.J. Deroo, T.K. Archer, Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo, *Oncogene* 20(24) (2001) 3039-46.
- [192] O.J. Schoneveld, I.C. Gaemers, W.H. Lamers, Mechanisms of glucocorticoid signalling, *Biochim Biophys Acta* 1680(2) (2004) 114-28.
- [193] K. De Bosscher, G. Haegeman, Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids, *Mol Endocrinol* 23(3) (2009) 281-91.
- [194] O. Kassel, P. Herrlich, Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects, *Mol Cell Endocrinol* 275(1-2) (2007) 13-29.
- [195] K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, G. Haegeman, Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB, *Oncogene* 25(51) (2006) 6868-86.
- [196] I.M. Beck, W. Vanden Berghe, L. Vermeulen, K.R. Yamamoto, G. Haegeman, K. De Bosscher, Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases, *Endocr Rev* 30(7) (2009) 830-82.

- [197] O. Kassel, S. Schneider, C. Heilbock, M. Litfin, M. Gottlicher, P. Herrlich, A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-kappaB-regulated promoters, *Genes Dev* 18(20) (2004) 2518-28.
- [198] S. Ogawa, J. Lozach, C. Benner, G. Pascual, R.K. Tangirala, S. Westin, A. Hoffmann, S. Subramaniam, M. David, M.G. Rosenfeld, C.K. Glass, Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors, *Cell* 122(5) (2005) 707-21.
- [199] Y. He, S.S. Simons, Jr., STAMP, a novel predicted factor assisting TIF2 actions in glucocorticoid receptor-mediated induction and repression, *Mol Cell Biol* 27(4) (2007) 1467-85.
- [200] S. Bilodeau, S. Vallette-Kasic, Y. Gauthier, D. Figarella-Branger, T. Brue, F. Berthelet, A. Lacroix, D. Batista, C. Stratakis, J. Hanson, B. Meij, J. Drouin, Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease, *Genes Dev* 20(20) (2006) 2871-86.
- [201] Y. Kamei, L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S.C. Lin, R.A. Heyman, D.W. Rose, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, *Cell* 85(3) (1996) 403-14.
- [202] K.A. Sheppard, K.M. Phelps, A.J. Williams, D. Thanos, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, M.E. Gerritsen, T. Collins, Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1, *The Journal of biological chemistry* 273(45) (1998) 29291-4.
- [203] T. Meyer, J.A. Gustafsson, J. Carlstedt-Duke, Glucocorticoid-dependent transcriptional repression of the osteocalcin gene by competitive binding at the TATA box, *DNA Cell Biol* 16(8) (1997) 919-27.
- [204] N. Sundahl, J. Bridelance, C. Libert, K. De Bosscher, I.M. Beck, Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds, *Pharmacology & therapeutics* 152 (2015) 28-41.
- [205] K.L. Gross, J.A. Cidlowski, Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair, *Trends Endocrinol Metab* 19(9) (2008) 331-9.
- [206] J.D. Turner, C.P. Muller, Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1, *J Mol Endocrinol* 35(2) (2005) 283-92.
- [207] Z. Saif, N.A. Hodyl, M.J. Stark, P.J. Fuller, T. Cole, N. Lu, V.L. Clifton, Expression of eight glucocorticoid receptor isoforms in the human preterm placenta vary with fetal sex and birthweight, *Placenta* 36(7) (2015) 723-30.
- [208] N.Z. Lu, J.A. Cidlowski, Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes, *Molecular cell* 18(3) (2005) 331-42.
- [209] M. Itoh, M. Adachi, H. Yasui, M. Takekawa, H. Tanaka, K. Imai, Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation, *Molecular endocrinology* 16(10) (2002) 2382-92.
- [210] A.D. Wallace, Y. Cao, S. Chandramouleeswaran, J.A. Cidlowski, Lysine 419 targets human glucocorticoid receptor for proteasomal degradation, *Steroids* 75(12) (2010) 1016-23.
- [211] A.D. Wallace, J.A. Cidlowski, Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids, *The Journal of biological chemistry* 276(46) (2001) 42714-21.
- [212] J.C. Webster, C.M. Jewell, J.E. Bodwell, A. Munck, M. Sar, J.A. Cidlowski, Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein, *The Journal of biological chemistry* 272(14) (1997) 9287-93.
- [213] A. Flotho, F. Melchior, Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease, *Annual review of biochemistry* 82 (2013) 357-85.
- [214] G. Hua, L. Paulen, P. Chambon, GR SUMOylation and formation of an SUMO-SMRT/NCOR1-HDAC3 repressing complex is mandatory for GC-induced IR nGRE-mediated transrepression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(5) (2016) E626-34.
- [215] S.A. Mason, P.R. Housley, Site-directed mutagenesis of the phosphorylation sites in the mouse glucocorticoid receptor, *The Journal of biological chemistry* 268(29) (1993) 21501-4.
- [216] D. Duma, C.M. Jewell, J.A. Cidlowski, Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 102(1-5) (2006) 11-21.

- [217] E.R. Weikum, M.T. Knuesel, E.A. Ortlund, K.R. Yamamoto, Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery, *Nat Rev Mol Cell Biol* 18(3) (2017) 159-174.
- [218] M.D. Galigniana, G. Piwien-Pilipuk, J. Assreuy, Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide, *Mol Pharmacol* 55(2) (1999) 317-23.
- [219] C.L. Smith, B.W. O'Malley, Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators, *Endocr Rev* 25(1) (2004) 45-71.
- [220] A.E. Wallberg, K.E. Neely, A.H. Hassan, J.A. Gustafsson, J.L. Workman, A.P. Wright, Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain, *Molecular and cellular biology* 20(6) (2000) 2004-13.
- [221] K.W. Trotter, H.A. King, T.K. Archer, Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activation via the BRG1-Dependent Recruitment of TOP2beta and Ku70/86, *Molecular and cellular biology* 35(16) (2015) 2799-817.
- [222] J.C. Blanco, S. Minucci, J. Lu, X.J. Yang, K.K. Walker, H. Chen, R.M. Evans, Y. Nakatani, K. Ozato, The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator, *Genes & development* 12(11) (1998) 1638-51.
- [223] X.F. Ding, C.M. Anderson, H. Ma, H. Hong, R.M. Uht, P.J. Kushner, M.R. Stallcup, Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities, *Molecular endocrinology* 12(2) (1998) 302-13.
- [224] J. Xu, Q. Li, Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family, *Mol Endocrinol* 17(9) (2003) 1681-92.
- [225] T. Ishizuka, M.A. Lazar, The nuclear receptor corepressor deacetylase activating domain is essential for repression by thyroid hormone receptor, *Mol Endocrinol* 19(6) (2005) 1443-51.
- [226] S.H. You, H.W. Lim, Z. Sun, M. Broache, K.J. Won, M.A. Lazar, Nuclear receptor co-repressors are required for the histone-deacetylase activity of HDAC3 in vivo, *Nat Struct Mol Biol* 20(2) (2013) 182-7.
- [227] A. Mottis, L. Mouchiroud, J. Auwerx, Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis, *Genes Dev* 27(8) (2013) 819-35.
- [228] G.E. Muscat, L.J. Burke, M. Downes, The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70, *Nucleic Acids Res* 26(12) (1998) 2899-907.
- [229] D.M. Heery, E. Kalkhoven, S. Hoare, M.G. Parker, A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors, *Nature* 387(6634) (1997) 733-6.
- [230] J.J. Voegel, M.J. Heine, M. Tini, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways, *EMBO J* 17(2) (1998) 507-19.
- [231] K.W. Nettles, G.L. Greene, Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors, *Annu Rev Physiol* 67 (2005) 309-33.
- [232] A.B. Johnson, B.W. O'Malley, Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy, *Mol Cell Endocrinol* 348(2) (2012) 430-9.
- [233] C. Li, R.C. Wu, L. Amazit, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, B.W. O'Malley, Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover, *Mol Cell Biol* 27(4) (2007) 1296-308.
- [234] B. Belandia, R.L. Orford, H.C. Hurst, M.G. Parker, Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes, *EMBO J* 21(15) (2002) 4094-103.
- [235] I. Rogatsky, H.F. Luecke, D.C. Leitman, K.R. Yamamoto, Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26) (2002) 16701-6.
- [236] Y. Chinenov, R. Gupte, J. Dobrovolna, J.R. Flammer, B. Liu, F.E. Michelassi, I. Rogatsky, Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(29) (2012) 11776-81.
- [237] Y. Chinenov, M.A. Sacta, A.R. Cruz, I. Rogatsky, GRIP1-associated SET-domain methyltransferase in glucocorticoid receptor target gene expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(51) (2008) 20185-90.
- [238] M.M. Reilly, C. Pantoja, X. Hu, Y. Chinenov, I. Rogatsky, The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression, *EMBO J* 25(1) (2006) 108-17.

- [239] M. Gehin, M. Mark, C. Dennefeld, A. Dierich, H. Gronemeyer, P. Chambon, The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP, *Mol Cell Biol* 22(16) (2002) 5923-37.
- [240] F. Picard, M. Gehin, J. Annicotte, S. Rocchi, M.F. Champy, B.W. O'Malley, P. Chambon, J. Auwerx, SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues, *Cell* 111(7) (2002) 931-41.
- [241] J. Xu, Y. Qiu, F.J. DeMayo, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, B.W. O'Malley, Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene, *Science* 279(5358) (1998) 1922-5.
- [242] M. Mark, H. Yoshida-Komiya, M. Gehin, L. Liao, M.J. Tsai, B.W. O'Malley, P. Chambon, J. Xu, Partially redundant functions of SRC-1 and TIF2 in postnatal survival and male reproduction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13) (2004) 4453-8.
- [243] J. Xu, R.C. Wu, B.W. O'Malley, Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family, *Nat Rev Cancer* 9(9) (2009) 615-30.
- [244] A.R. Clark, Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes, *Molecular and cellular endocrinology* 275(1-2) (2007) 79-97.
- [245] H.M. Reichardt, K.H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel, G. Schutz, DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival, *Cell* 93(4) (1998) 531-41.
- [246] S. Heck, M. Kullmann, A. Gast, H. Ponta, H.J. Rahmsdorf, P. Herrlich, A.C. Cato, A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1, *Embo J* 13(17) (1994) 4087-95.
- [247] H.M. Reichardt, J.P. Tuckermann, M. Gottlicher, M. Vujic, F. Weih, P. Angel, P. Herrlich, G. Schutz, Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor, *The EMBO journal* 20(24) (2001) 7168-73.
- [248] A.R. Clark, M.G. Belvisi, Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor, *Pharmacol Ther* 134(1) (2012) 54-67.
- [249] S. Hubner, L. Dejager, C. Libert, J.P. Tuckermann, The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough, *Biol Chem* 396(11) (2015) 1223-31.
- [250] H. Schacke, W.D. Docke, K. Asadullah, Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids, *Pharmacology & therapeutics* 96(1) (2002) 23-43.
- [251] S.H. Meijsing, M.A. Pufall, A.Y. So, D.L. Bates, L. Chen, K.R. Yamamoto, DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity, *Science* 324(5925) (2009) 407-10.
- [252] I. Rogatsky, J.C. Wang, M.K. Derynck, D.F. Nonaka, D.B. Khodabakhsh, C.M. Haqq, B.D. Darimont, M.J. Garabedian, K.R. Yamamoto, Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24) (2003) 13845-50.
- [253] C.M. Jewell, A.B. Scoltock, B.L. Hamel, M.R. Yudt, J.A. Cidlowski, Complex human glucocorticoid receptor dim mutations define glucocorticoid induced apoptotic resistance in bone cells, *Molecular endocrinology* 26(2) (2012) 244-56.
- [254] J.C. Gebhardt, D.M. Suter, R. Roy, Z.W. Zhao, A.R. Chapman, S. Basu, T. Maniatis, X.S. Xie, Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells, *Nat Methods* 10(5) (2013) 421-6.
- [255] O. Wrangé, P. Eriksson, T. Perlmann, The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer, *J Biol Chem* 264(9) (1989) 5253-9.
- [256] J. Drouin, Y.L. Sun, S. Tremblay, P. Lavender, T.J. Schmidt, A. de Lean, M. Nemer, Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor, *Mol Endocrinol* 6(8) (1992) 1299-309.
- [257] W. Cairns, C. Cairns, I. Pongratz, L. Poellinger, S. Okret, Assembly of a glucocorticoid receptor complex prior to DNA binding enhances its specific interaction with a glucocorticoid response element, *J Biol Chem* 266(17) (1991) 11221-6.
- [258] I. Segard-Maurel, K. Rajkowski, N. Jibard, G. Schweizer-Groyer, E.E. Baulieu, F. Cadepond, Glucocorticosteroid receptor dimerization investigated by analysis of receptor binding to glucocorticosteroid responsive elements using a monomer-dimer equilibrium model, *Biochemistry* 35(5) (1996) 1634-42.
- [259] K. Dahlman-Wright, H. Siltala-Roos, J. Carlstedt-Duke, J.A. Gustafsson, Protein-protein interactions facilitate DNA binding by the glucocorticoid receptor DNA-binding domain, *J Biol Chem* 265(23) (1990) 14030-5.

- [260] K. Dahlman-Wright, A. Wright, J.A. Gustafsson, J. Carlstedt-Duke, Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids, *J Biol Chem* 266(5) (1991) 3107-12.
- [261] S.Y. Tsai, J. Carlstedt-Duke, N.L. Weigel, K. Dahlman, J.A. Gustafsson, M.J. Tsai, B.W. O'Malley, Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation, *Cell* 55(2) (1988) 361-9.
- [262] J.G. Savory, G.G. Prefontaine, C. Lamprecht, M. Liao, R.F. Walther, Y.A. Lefebvre, R.J. Hache, Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces, *Mol Cell Biol* 21(3) (2001) 781-93.
- [263] L.D. Alvarez, Síntesis, actividad biológica y bases moleculares de acción de análogos rígidos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales, Química Organica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2009.
- [264] H. Derendorf, G. Hochhaus, H. Mollmann, J. Barth, M. Krieg, S. Tunn, C. Mollmann, Receptor-based pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of corticosteroids, *J Clin Pharmacol* 33(2) (1993) 115-23.
- [265] A.E. Coutinho, K.E. Chapman, The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights, *Mol Cell Endocrinol* 335(1) (2011) 2-13.
- [266] J.G. Hardman, L.E. Limburt, A.G. Gilman, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, 2000.
- [267] G.P. Vicent, M.C. Monteserin, A.S. Veleiro, G. Burton, C.P. Lantos, M.D. Galigniana, 21-Hydroxy-6,19-oxidoprogesterone: a novel synthetic steroid with specific antiglucocorticoid properties in the rat, *Mol Pharmacol* 52(4) (1997) 749-53.
- [268] A. Pecci, L.D. Alvarez, A.S. Veleiro, N.R. Ceballos, C.P. Lantos, G. Burton, New lead compounds in the search for pure antiglucocorticoids and the dissociation of antiglucocorticoid effects, *J Steroid Biochem Mol Biol* 113(3-5) (2009) 155-62.
- [269] L.D. Alvarez, M.A. Marti, A.S. Veleiro, D.M. Presman, D.A. Estrin, A. Pecci, G. Burton, Exploring the molecular basis of action of the passive antiglucocorticoid 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone, *J Med Chem* 51(5) (2008) 1352-60.
- [270] D.M. Presman, L.D. Alvarez, V. Levi, S. Eduardo, M.A. Digman, M.A. Marti, A.S. Veleiro, G. Burton, A. Pecci, Insights on glucocorticoid receptor activity modulation through the binding of rigid steroids, *PLoS One* 5(10) (2010) e13279.
- [271] A.J. Orqueda, M.V. Dansey, A. Espanol, A.S. Veleiro, E. Bal de Kier Joffe, M.E. Sales, G. Burton, A. Pecci, The rigid steroid 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone (21OH-6,19OP) is a dissociated glucocorticoid receptor modulator potentially useful as a novel coadjuvant in breast cancer chemotherapy, *Biochem Pharmacol* 89(4) (2014) 526-35.
- [272] A. Pecci, L.D. Alvarez, D.M. Presman, G. Burton, 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone: a Promising Therapeutic Agent and a Molecular Tool for Deciphering Glucocorticoid Action, *Mini Rev Med Chem* (2016).
- [273] J. Speil, E. Baumgart, J.P. Siebrasse, R. Veith, U. Vinkemeier, U. Kubitscheck, Activated STAT1 transcription factors conduct distinct saltatory movements in the cell nucleus, *Biophys J* 101(11) (2011) 2592-600.
- [274] J.B. Grimm, B.P. English, J. Chen, J.P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J.J. Macklin, D. Normanno, R.H. Singer, T. Lionnet, L.D. Lavis, A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy, *Nat Methods* 12(3) (2015) 244-50, 3 p following 250.
- [275] J. Lippincott-Schwartz, G.H. Patterson, Development and use of fluorescent protein markers in living cells, *Science* 300(5616) (2003) 87-91.
- [276] P. Kett, B. Geiger, V. Ehemann, D. Komitowski, Three-dimensional analysis of cell nucleus structures visualized by confocal scanning laser microscopy, *J Microsc* 167(Pt 2) (1992) 169-79.
- [277] T.J. Fellers, M.W. Davidson, Introduction to Confocal Microscopy, 2007. <http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>.
- [278] R.K. Benninger, D.W. Piston, Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues, *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 4 (2013) Unit 4 11 1-24.
- [279] J. Langowski, Single plane illumination microscopy as a tool for studying nucleome dynamics, *Methods* 123 (2017) 3-10.

- [280] K.R. Spring, T.J. Fellers, M.W. Davidson, Resolution and Contrast in Confocal Microscopy, 2004. <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/resolutionintro/>.
- [281] E.L. Elson, Brief introduction to fluorescence correlation spectroscopy, *Methods Enzymol* 518 (2013) 11-41.
- [282] F. Mueller, T.J. Stasevich, D. Mazza, J.G. McNally, Quantifying transcription factor kinetics: at work or at play?, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48(5) (2013) 492-514.
- [283] D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W.W. Webb, Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics, *Biophys J* 16(9) (1976) 1055-69.
- [284] F. Mueller, T.S. Karpova, D. Mazza, J.G. McNally, Monitoring dynamic binding of chromatin proteins in vivo by fluorescence recovery after photobleaching, *Methods Mol Biol* 833 (2012) 153-76.
- [285] F. Mueller, D. Mazza, T.J. Stasevich, J.G. McNally, FRAP and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics: what do we really know?, *Curr Opin Cell Biol* 22(3) (2010) 403-11.
- [286] K.J. Solarczyk, M. Zarebski, J.W. Dobrucki, Inducing local DNA damage by visible light to study chromatin repair, *DNA Repair (Amst)* 11(12) (2012) 996-1002.
- [287] E.M. Manders, A.E. Visser, A. Koppen, W.C. de Leeuw, R. van Liere, G.J. Brakenhoff, R. van Driel, Four-dimensional imaging of chromatin dynamics during the assembly of the interphase nucleus, *Chromosome Res* 11(5) (2003) 537-47.
- [288] P. Schwille, E. Haustein, Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications, 2006.
- [289] S. Weidtkamp-Peters, K. Weissart, L. Schmiedeberg, P. Hemmerich, Fluorescence correlation spectroscopy to assess the mobility of nuclear proteins, *Methods Mol Biol* 464 (2009) 321-41.
- [290] A. Michelman-Ribeiro, D. Mazza, T. Rosales, T.J. Stasevich, H. Boukari, V. Rishi, C. Vinson, J.R. Knutson, J.G. McNally, Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys J* 97(1) (2009) 337-46.
- [291] Z. Petrasek, J.S. Ries, P., Scanning FCS for the characterization of protein dynamics in live cells, in: N. Walter (Ed.), *Single Molecule Tools: Fluorescence Based Approaches*, *Methods in Enzymology* 2010, pp. 317-343.
- [292] B. Hebert, S. Costantino, P.W. Wiseman, Spatiotemporal image correlation spectroscopy (STICS) theory, verification, and application to protein velocity mapping in living CHO cells, *Biophys J* 88(5) (2005) 3601-14.
- [293] Y. Chen, L.N. Wei, J.D. Muller, Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(26) (2003) 15492-7.
- [294] H. Chen, E.R. Farkas, W.W. Webb, Chapter 1: In vivo applications of fluorescence correlation spectroscopy, *Methods Cell Biol* 89 (2008) 3-35.
- [295] C.M. Brown, R.B. Dalal, B. Hebert, M.A. Digman, A.R. Horwitz, E. Gratton, Raster image correlation spectroscopy (RICS) for measuring fast protein dynamics and concentrations with a commercial laser scanning confocal microscope, *J Microsc* 229(Pt 1) (2008) 78-91.
- [296] P.N. Hedde, M. Stakic, E. Gratton, Rapid measurement of molecular transport and interaction inside living cells using single plane illumination, *Sci Rep* 4 (2014) 7048.
- [297] M.A. Digman, E. Gratton, Imaging barriers to diffusion by pair correlation functions, *Biophys J* 97(2) (2009) 665-73.
- [298] E. Hinde, F. Cardarelli, M.A. Digman, E. Gratton, In vivo pair correlation analysis of EGFP intranuclear diffusion reveals DNA-dependent molecular flow, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(38) (2010) 16560-16565.
- [299] L. Malacrida, P.N. Hedde, S. Ranjit, F. Cardarelli, E. Gratton, Visualization of barriers and obstacles to molecular diffusion in live cells by spatial pair-cross-correlation in two dimensions, *Biomed Opt Express* 9(1) (2018) 303-321.
- [300] D.M. Presman, D.A. Ball, V. Paakinaho, J.B. Grimm, L.D. Lavis, T.S. Karpova, G.L. Hager, Quantifying transcription factor binding dynamics at the single-molecule level in live cells, *Methods* 123 (2017) 76-88.

- [301] N. Chenouard, I. Smal, F. de Chaumont, M. Maska, I.F. Sbalzarini, Y. Gong, J. Cardinale, C. Carthel, S. Coraluppi, M. Winter, A.R. Cohen, W.J. Godinez, K. Rohr, Y. Kalaidzidis, L. Liang, J. Duncan, H. Shen, Y. Xu, K.E. Magnusson, J. Jalden, H.M. Blau, P. Paul-Gilloteaux, P. Roudot, C. Kervrann, F. Waharte, J.Y. Tinevez, S.L. Shorte, J. Willemse, K. Celler, G.P. van Wezel, H.W. Dan, Y.S. Tsai, C. Ortiz de Solorzano, J.C. Olivo-Marin, E. Meijering, Objective comparison of particle tracking methods, *Nat Methods* 11(3) (2014) 281-9.
- [302] G.V. Los, L.P. Encell, M.G. McDougall, D.D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M.G. Wood, R. Learish, R.F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D.H. Klaubert, R.F. Bulleit, K.V. Wood, HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis, *ACS Chem Biol* 3(6) (2008) 373-82.
- [303] D. Mazza, A. Abernathy, N. Golob, T. Morisaki, J.G. McNally, A benchmark for chromatin binding measurements in live cells, *Nucleic acids research* 40(15) (2012) e119.
- [304] M. Woring, X. Darzacq, I. Izeddin, Geometry of the nucleus: a perspective on gene expression regulation, *Curr Opin Chem Biol* 20 (2014) 112-9.
- [305] A. Bancaud, S. Huet, N. Daigle, J. Mozziconacci, J. Beaudouin, J. Ellenberg, Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin, *Embo J* 28(24) (2009) 3785-98.
- [306] E. Lieberman-Aiden, N.L. van Berkum, L. Williams, M. Imakaev, T. Ragoczy, A. Telling, I. Amit, B.R. Lajoie, P.J. Sabo, M.O. Dorschner, R. Sandstrom, B. Bernstein, M.A. Bender, M. Groudine, A. Gnirke, J. Stamatoyannopoulos, L.A. Mirny, E.S. Lander, J. Dekker, Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome, *Science* 326(5950) (2009) 289-93.
- [307] M. Baum, F. Erdel, M. Wachsmuth, K. Rippe, Retrieving the intracellular topology from multi-scale protein mobility mapping in living cells, *Nat Commun* 5 (2014) 4494.
- [308] C. Di Rienzo, V. Piazza, E. Gratton, F. Beltram, F. Cardarelli, Probing short-range protein Brownian motion in the cytoplasm of living cells, *Nat Commun* 5 (2014) 5891.
- [309] G. Guigas, C. Kalla, M. Weiss, Probing the nanoscale viscoelasticity of intracellular fluids in living cells, *Biophys J* 93(1) (2007) 316-23.
- [310] X. Wang, Z. Kam, P.M. Carlton, L. Xu, J.W. Sedat, E.H. Blackburn, Rapid telomere motions in live human cells analyzed by highly time-resolved microscopy, *Epigenetics Chromatin* 1(1) (2008) 4.
- [311] M. Muratani, D. Gerlich, S.M. Janicki, M. Gebhard, R. Eils, D.L. Spector, Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus, *Nat Cell Biol* 4(2) (2002) 106-10.
- [312] J.R. Chubb, S. Boyle, P. Perry, W.A. Bickmore, Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells, *Curr Biol* 12(6) (2002) 439-45.
- [313] H. Liu, P. Dong, M.S. Ioannou, L. Li, J. Shea, H.A. Pasoli, J.B. Grimm, P.K. Rivlin, L.D. Lavis, M. Koyama, Z. Liu, Visualizing long-term single-molecule dynamics in vivo by stochastic protein labeling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(2) (2018) 343-348.
- [314] B.L. Sprague, R.L. Pego, D.A. Stavreva, J.G. McNally, Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching, *Biophys J* 86(6) (2004) 3473-95.
- [315] F. Mueller, P. Wach, J.G. McNally, Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching, *Biophys J* 94(8) (2008) 3323-39.
- [316] I. Izeddin, V. Recamier, L. Bosanac, Cisse, II, L. Boudarene, C. Dugast-Darzacq, F. Proux, O. Benichou, R. Voituriez, O. Bensaud, M. Dahan, X. Darzacq, Single-molecule tracking in live cells reveals distinct target-search strategies of transcription factors in the nucleus, *Elife* 3 (2014).
- [317] J. Chen, Z. Zhang, L. Li, B.C. Chen, A. Revyakin, B. Hajj, W. Legant, M. Dahan, T. Lionnet, E. Betzig, R. Tjian, Z. Liu, Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells, *Cell* 156(6) (2014) 1274-85.
- [318] R.D. Phair, T. Misteli, Kinetic modelling approaches to in vivo imaging, *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(12) (2001) 898-907.
- [319] P. Schuille, J. Bieschke, F. Oehlenschlaeger, Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies, *Biophys Chem* 66(2-3) (1997) 211-28.
- [320] S. Mikuni, M. Tamura, M. Kinjo, Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy, *FEBS Lett* 581(3) (2007) 389-93.

- [321] M. Renz, J. Langowski, Dynamics of the CapG actin-binding protein in the cell nucleus studied by FRAP and FCS, *Chromosome Res* 16(3) (2008) 427-37.
- [322] P. Hemmerich, L. Schmiedeberg, S. Diekmann, Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance, *Chromosome Res* 19(1) (2011) 131-51.
- [323] T.J. Stasevich, F. Mueller, A. Michelman-Ribeiro, T. Rosales, J.R. Knutson, J.G. McNally, Cross-validating FRAP and FCS to quantify the impact of photobleaching on in vivo binding estimates, *Biophys J* 99(9) (2010) 3093-101.
- [324] P. de Graaf, F. Mousson, B. Geverts, E. Scheer, L. Tora, A.B. Houtsmuller, H.T. Timmers, Chromatin interaction of TATA-binding protein is dynamically regulated in human cells, *Journal of cell science* 123(Pt 15) (2010) 2663-71.
- [325] R.D. Phair, P. Scaffidi, C. Elbi, J. Vecerova, A. Dey, K. Ozato, D.T. Brown, G. Hager, M. Bustin, T. Misteli, Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins, *Mol Cell Biol* 24(14) (2004) 6393-402.
- [326] P. Brazda, T. Szekeres, B. Bravics, K. Toth, G. Vamosi, L. Nagy, Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility, *J Cell Sci* 124(Pt 21) (2011) 3631-42.
- [327] T. Sekiya, U.M. Muthurajan, K. Luger, A.V. Tulin, K.S. Zaret, Nucleosome-binding affinity as a primary determinant of the nuclear mobility of the pioneer transcription factor FoxA, *Genes & development* 23(7) (2009) 804-9.
- [328] D. Normanno, L. Boudarene, C. Dugast-Darzacq, J. Chen, C. Richter, F. Proux, O. Benichou, R. Voituriez, X. Darzacq, M. Dahan, Probing the target search of DNA-binding proteins in mammalian cells using TetR as model searcher, *Nat Commun* 6 (2015) 7357.
- [329] D.A. Stavreva, W.G. Muller, G.L. Hager, C.L. Smith, J.G. McNally, Rapid glucocorticoid receptor exchange at a promoter is coupled to transcription and regulated by chaperones and proteasomes, *Molecular and cellular biology* 24(7) (2004) 2682-97.
- [330] R.O. Sprouse, T.S. Karpova, F. Mueller, A. Dasgupta, J.G. McNally, D.T. Auble, Regulation of TATA-binding protein dynamics in living yeast cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(36) (2008) 13304-8.
- [331] B.M. Mayr, E. Guzman, M. Montminy, Glutamine rich and basic region/leucine zipper (bZIP) domains stabilize cAMP-response element-binding protein (CREB) binding to chromatin, *The Journal of biological chemistry* 280(15) (2005) 15103-10.
- [332] C.R. Lickwar, F. Mueller, S.E. Hanlon, J.G. McNally, J.D. Lieb, Genome-wide protein-DNA binding dynamics suggest a molecular clutch for transcription factor function, *Nature* 484(7393) (2012) 251-5.
- [333] T. Perlmann, P. Eriksson, O. Wrange, Quantitative analysis of the glucocorticoid receptor-DNA interaction at the mouse mammary tumor virus glucocorticoid response element, *The Journal of biological chemistry* 265(28) (1990) 17222-9.
- [334] J.G. McNally, W.G. Muller, D. Walker, R. Wolford, G.L. Hager, The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells, *Science* 287(5456) (2000) 1262-5.
- [335] D. Bosisio, I. Marazzi, A. Agresti, N. Shimizu, M.E. Bianchi, G. Natoli, A hyper-dynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF-kappaB-dependent gene activity, *The EMBO journal* 25(4) (2006) 798-810.
- [336] T.S. Karpova, M.J. Kim, C. Spriet, K. Nalley, T.J. Stasevich, Z. Kherrouche, L. Heliot, J.G. McNally, Concurrent fast and slow cycling of a transcriptional activator at an endogenous promoter, *Science* 319(5862) (2008) 466-9.
- [337] J. Yao, K.M. Munson, W.W. Webb, J.T. Lis, Dynamics of heat shock factor association with native gene loci in living cells, *Nature* 442(7106) (2006) 1050-3.
- [338] D. Normanno, M. Dahan, X. Darzacq, Intra-nuclear mobility and target search mechanisms of transcription factors: a single-molecule perspective on gene expression, *Biochim Biophys Acta* 1819(6) (2012) 482-93.
- [339] L. Mirny, M. Slutsky, Z. Wunderlich, A. Tafvizi, J. Leith, A. Kosmrlj, How a protein searches for its site on DNA: the mechanism of facilitated diffusion, *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical* 42(43) (2009).
- [340] O. Benichou, C. Chevalier, B. Meyer, R. Voituriez, Facilitated diffusion of proteins on chromatin, *Phys Rev Lett* 106(3) (2011) 038102.

- [341] J. Gorman, F. Wang, S. Redding, A.J. Plys, T. Fazio, S. Wind, E.E. Alani, E.C. Greene, Single-molecule imaging reveals target-search mechanisms during DNA mismatch repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(45) (2012) E3074-83.
- [342] P. Hammar, P. Leroy, A. Mahmutovic, E.G. Marklund, O.G. Berg, J. Elf, The lac repressor displays facilitated diffusion in living cells, *Science* 336(6088) (2012) 1595-8.
- [343] T. Sunami, H. Kono, Local conformational changes in the DNA interfaces of proteins, *PLoS One* 8(2) (2013) e56080.
- [344] X. Darzacq, Y. Shav-Tal, V. de Turris, Y. Brody, S.M. Shenoy, R.D. Phair, R.H. Singer, In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription, *Nature structural & molecular biology* 14(9) (2007) 796-806.
- [345] O. Benichou, C. Chevalier, J. Klafter, B. Meyer, R. Voituriez, Geometry-controlled kinetics, *Nat Chem* 2(6) (2010) 472-7.
- [346] G.L. Hager, J.G. McNally, T. Misteli, Transcription dynamics, *Mol Cell* 35(6) (2009) 741-53.
- [347] C.Y. Lin, J. Loven, P.B. Rahl, R.M. Paranal, C.B. Burge, J.E. Bradner, T.I. Lee, R.A. Young, Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc, *Cell* 151(1) (2012) 56-67.
- [348] B. van Steensel, M. Brink, K. van der Meulen, E.P. van Binnendijk, D.G. Wansink, L. de Jong, E.R. de Kloet, R. van Driel, Localization of the glucocorticoid receptor in discrete clusters in the cell nucleus, *J Cell Sci* 108 (Pt 9) (1995) 3003-11.
- [349] M.J. Schaaf, L.J. Lewis-Tuffin, J.A. Cidlowski, Ligand-selective targeting of the glucocorticoid receptor to nuclear subdomains is associated with decreased receptor mobility, *Mol Endocrinol* 19(6) (2005) 1501-15.
- [350] H. Htun, J. Barsony, I. Renyi, D.L. Gould, G.L. Hager, Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10) (1996) 4845-50.
- [351] R.A. Coleman, Z. Liu, X. Darzacq, R. Tjian, R.H. Singer, T. Lionnet, Imaging Transcription: Past, Present, and Future, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 80 (2015) 1-8.
- [352] M.A. Grande, I. van der Kraan, L. de Jong, R. van Driel, Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II, *J Cell Sci* 110 (Pt 15) (1997) 1781-91.
- [353] A. Griekspoor, W. Zwart, J. Neefjes, R. Michalides, Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells, *Nucl Recept Signal* 5 (2007) e003.
- [354] S. Kumar, M. Saradhi, N.K. Chaturvedi, R.K. Tyagi, Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview, *Mol Cell Endocrinol* 246(1-2) (2006) 147-56.
- [355] B.E. Black, B.M. Paschal, Intranuclear organization and function of the androgen receptor, *Trends Endocrinol Metab* 15(9) (2004) 411-7.
- [356] R.L. Arnett-Mansfield, J.D. Graham, A.R. Hanson, P.A. Mote, A. Gompel, L.L. Scurr, N. Gava, A. de Fazio, C.L. Clarke, Focal subnuclear distribution of progesterone receptor is ligand dependent and associated with transcriptional activity, *Mol Endocrinol* 21(1) (2007) 14-29.
- [357] M.J. Schaaf, J.A. Cidlowski, Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity, *Mol Cell Biol* 23(6) (2003) 1922-34.
- [358] S.H. Meijsing, C. Elbi, H.F. Luecke, G.L. Hager, K.R. Yamamoto, The ligand binding domain controls glucocorticoid receptor dynamics independent of ligand release, *Mol Cell Biol* 27(7) (2007) 2442-51.
- [359] T. Kino, S.H. Liou, E. Charmandari, G.P. Chrousos, Glucocorticoid receptor mutants demonstrate increased motility inside the nucleus of living cells: time of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) is an integrated measure of receptor function, *Mol Med* 10(7-12) (2004) 80-8.
- [360] F.L. Groeneweg, M.E. van Royen, S. Fenz, V.I. Keizer, B. Geverts, J. Prins, E.R. de Kloet, A.B. Houtsmuller, T.S. Schmidt, M.J. Schaaf, Quantitation of glucocorticoid receptor DNA-binding dynamics by single-molecule microscopy and FRAP, *PLoS One* 9(3) (2014) e90532.
- [361] T. Morisaki, W.G. Muller, N. Golob, D. Mazza, J.G. McNally, Single-molecule analysis of transcription factor binding at transcription sites in live cells, *Nat Commun* 5 (2014) 4456.
- [362] V. Paakinaho, D.M. Presman, D.A. Ball, T.A. Johnson, R.L. Schiltz, P. Levitt, D. Mazza, T. Morisaki, T.S. Karpova, G.L. Hager, Single-molecule analysis of steroid receptor and cofactor action in living cells, *Nature communications* 8 (2017) 15896.
- [363] G. Burton, Lantos, Carlos P. , Veleiro, Adriana Silvia, Method for the preparation of 21-hydroxy-6,19-oxidoprogesterone (21OH-6OP), *Applied Research Systems ARS Holding N.V. (Curacao, AN), United States*, 2009.

- [364] M.D. Galigniana, J.L. Scruggs, J. Herrington, M.J. Welsh, C. Carter-Su, P.R. Housley, W.B. Pratt, Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton, *Mol Endocrinol* 12(12) (1998) 1903-13.
- [365] I.M.W. Nojek, S.E., G.P. Colo, F.M. Rubio, L.D. Franco, V.E. Nahmod, M.A. Costas, Different enzymatic activities recruitment by specific domains of TIF2 are involved in NF- κ B transactivation, *Medicina (B.Aires)* 64(2) (2004) 4.
- [366] T.C. Voss, R.L. Schiltz, M.H. Sung, T.A. Johnson, S. John, G.L. Hager, Combinatorial probabilistic chromatin interactions produce transcriptional heterogeneity, *J Cell Sci* 122(Pt 3) (2009) 345-56.
- [367] H.S. Nam, R. Benezra, High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells, *Cell Stem Cell* 5(5) (2009) 515-26.
- [368] K.B. Horwitz, D.T. Zava, A.K. Thilagar, E.M. Jensen, W.L. McGuire, Steroid receptor analyses of nine human breast cancer cell lines, *Cancer Res* 38(8) (1978) 2434-7.
- [369] M. Truss, J. Bartsch, A. Schelbert, R.J. Hache, M. Beato, Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo, *The EMBO journal* 14(8) (1995) 1737-51.
- [370] C. Sommer, C.N. Straehle, U. Kothe, F.A. Hamprecht, ilastik: Interactive Learning and Segmentation Toolkit, Eighth IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI). Proceedings, Chicago, IL 2011, pp. 230-233.
- [371] S. Bolte, F.P. Cordelieres, A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy, *J Microsc* 224(Pt 3) (2006) 213-32.
- [372] A. Anzalone, P. Annibale, E. Gratton, 3D orbital tracking in a modified two-photon microscope: an application to the tracking of intracellular vesicles, *J Vis Exp* (92) (2014) e51794.
- [373] J.F. Angiolini, N. Plachta, E. Mocskos, V. Levi, Exploring the Dynamics of Cell Processes through Simulations of Fluorescence Microscopy Experiments, *Biophys J* 108 (2015) 2613-2618.
- [374] M.G. Otero, M. Alloatti, L.E. Cromberg, A. Almenar-Queralt, S.E. Encalada, V.M. Pozo Devoto, L. Bruno, L.S. Goldstein, T.L. Falzone, Fast axonal transport of the proteasome complex depends on membrane interaction and molecular motor function, *J Cell Sci* 127(Pt 7) (2014) 1537-49.
- [375] P. Annibale, E. Gratton, Single cell visualization of transcription kinetics variance of highly mobile identical genes using 3D nanoimaging, *Sci Rep* 5 (2015) 9258.
- [376] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, New York, NY, USA, 2006.
- [377] M.D. White, J.F. Angiolini, Y.D. Alvarez, G. Kaur, Z.W. Zhao, E. Mocskos, L. Bruno, S. Bissiere, V. Levi, N. Plachta, Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo, *Cell* 165(1) (2016) 75-87.
- [378] M.A. Digman, R. Dalal, A.F. Horwitz, E. Gratton, Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope, *Biophys J* 94(6) (2008) 2320-32.
- [379] L.A. Marascuilo, Large-sample multiple comparisons, *Psychol Bull* 65(5) (1966) 280-90.
- [380] S.K. Zaidi, D.W. Young, J.Y. Choi, J. Pratap, A. Javed, M. Montecino, J.L. Stein, A.J. van Wijnen, J.B. Lian, G.S. Stein, The dynamic organization of gene-regulatory machinery in nuclear microenvironments, *EMBO Rep* 6(2) (2005) 128-33.
- [381] H. Ogawa, R.T. Yu, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, Y. Nakatani, K. Morohashi, K. Umesono, Nuclear structure-associated TIF2 recruits glucocorticoid receptor and its target DNA, *Biochem Biophys Res Commun* 320(1) (2004) 218-25.
- [382] C.T. Baumann, H. Ma, R. Wolford, J.C. Reyes, P. Maruvada, C. Lim, P.M. Yen, M.R. Stallcup, G.L. Hager, The glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) localizes in discrete nuclear foci that associate with ND10 bodies and are enriched in components of the 26S proteasome, *Mol Endocrinol* 15(4) (2001) 485-500.
- [383] T.C. Voss, I.A. Demarco, C.F. Booker, R.N. Day, Functional interactions with Pit-1 reorganize co-repressor complexes in the living cell nucleus, *J Cell Sci* 118(Pt 15) (2005) 3277-88.
- [384] D. Szapary, Y. Huang, S.S. Simons, Jr., Opposing effects of corepressor and coactivators in determining the dose-response curve of agonists, and residual agonist activity of antagonists, for glucocorticoid receptor-regulated gene expression, *Mol Endocrinol* 13(12) (1999) 2108-21.
- [385] T.C. Voss, I.A. Demarco, C.F. Booker, R.N. Day, Quantitative methods to analyze subnuclear protein organization in cell populations with varying degrees of protein expression, *J Biomed Opt* 10(2) (2005) 024011.

- [386] S.L. Chen, S.C. Wang, B. Hosking, G.E. Muscat, Subcellular localization of the steroid receptor coactivators (SRCs) and MEF2 in muscle and rhabdomyosarcoma cells, *Mol Endocrinol* 15(5) (2001) 783-96.
- [387] D.M. Presman, V. Levi, O.P. Pignataro, A. Pecci, Melatonin inhibits glucocorticoid-dependent GR-TIF2 interaction in newborn hamster kidney (BHK) cells, *Mol Cell Endocrinol* 349(2) (2012) 214-21.
- [388] M. Staufenbiel, W. Deppert, Preparation of nuclear matrices from cultured cells: subfractionation of nuclei in situ, *J Cell Biol* 98(5) (1984) 1886-94.
- [389] S.V. Razin, V.V. Borunova, O.V. Iarovaia, Y.S. Vassetzky, Nuclear matrix and structural and functional compartmentalization of the eucaryotic cell nucleus, *Biochemistry (Mosc)* 79(7) (2014) 608-18.
- [390] A.M. Martelli, E. Falcieri, M. Zweyer, R. Bortul, G. Tabellini, A. Cappellini, L. Cocco, L. Manzoli, The controversial nuclear matrix: a balanced point of view, *Histol Histopathol* 17(4) (2002) 1193-205.
- [391] N. Dross, C. Spriet, M. Zwerger, G. Muller, W. Waldeck, J. Langowski, Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei, *PLoS One* 4(4) (2009) e5041.
- [392] J.J. Voegel, M.J. Heine, C. Zechel, P. Chambon, H. Gronemeyer, TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors, *Embo J* 15(14) (1996) 3667-75.
- [393] P.R. Kramer, G. Fragoso, W. Pennie, H. Htun, G.L. Hager, R.R. Sinden, Transcriptional state of the mouse mammary tumor virus promoter can affect topological domain size in vivo, *J Biol Chem* 274(40) (1999) 28590-7.
- [394] D. Walker, H. Htun, G.L. Hager, Using inducible vectors to study intracellular trafficking of GFP-tagged steroid/nuclear receptors in living cells, *Methods* 19(3) (1999) 386-93.
- [395] W.G. Muller, D. Walker, G.L. Hager, J.G. McNally, Large-scale chromatin decondensation and recondensation regulated by transcription from a natural promoter, *J Cell Biol* 154(1) (2001) 33-48.
- [396] E.M. Smith, J.D. Mueller, The statistics of protein expression ratios for cellular fluorescence studies, *Eur Biophys J* 41(3) (2012) 341-52.
- [397] S. Gessi, S. Merighi, P.A. Borea, Glucocorticoid's pharmacology: past, present and future, *Curr Pharm Des* 16(32) (2010) 3540-53.
- [398] K. Ronacher, K. Hadley, C. Avenant, E. Stubbsrud, S.S. Simons, Jr., A. Louw, J.P. Hapgood, Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction, *Molecular and cellular endocrinology* 299(2) (2009) 219-31.
- [399] D.M. Cohen, D.J. Steger, Nuclear Receptor Function through Genomics: Lessons from the Glucocorticoid Receptor, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 28(7) (2017) 531-540.
- [400] S. Mikuni, J. Yamamoto, T. Horio, M. Kinjo, Negative Correlation between the Diffusion Coefficient and Transcriptional Activity of the Glucocorticoid Receptor, *Int J Mol Sci* 18(9) (2017).
- [401] S.T. Liu, G.Y. Lu, Y.J. Hsu, L.C. Chang, C.L. Ho, S.M. Huang, Dual roles for lysine 490 of promyelocytic leukemia protein in the transactivation of glucocorticoid receptor-interacting protein 1, *Biochim Biophys Acta* 1833(8) (2013) 1799-810.
- [402] V.J. LaMorte, J.A. Dyck, R.L. Ochs, R.M. Evans, Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9) (1998) 4991-6.
- [403] V. Doucas, M. Tini, D.A. Egan, R.M. Evans, Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6) (1999) 2627-32.
- [404] K.L. Borden, Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies, *Mol Cell Biol* 22(15) (2002) 5259-69.
- [405] C. Yu, N. Yap, D. Chen, S. Cheng, Modulation of hormone-dependent transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by the tumor suppressor p53, *Cancer Lett* 116(2) (1997) 191-6.
- [406] P. Singh, S.W. Chan, W. Hong, Retinoblastoma protein is functionally distinct from its homologues in affecting glucocorticoid receptor-mediated transcription and apoptosis, *J Biol Chem* 276(17) (2001) 13762-70.
- [407] Y. Le Drean, N. Mincheneau, P. Le Goff, D. Michel, Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation, *Endocrinology* 143(9) (2002) 3482-9.
- [408] E.E. Swinstead, T.B. Miranda, V. Paakinaho, S. Baek, I. Goldstein, M. Hawkins, T.S. Karpova, D. Ball, D. Mazza, L.D. Lavis, J.B. Grimm, T. Morisaki, L. Grontved, D.M. Presman, G.L. Hager, Steroid Receptors Reprogram FoxA1 Occupancy through Dynamic Chromatin Transitions, *Cell* 165(3) (2016) 593-605.

- [409] M. Doucleff, G.M. Clore, Global jumping and domain-specific intersegment transfer between DNA cognate sites of the multidomain transcription factor Oct-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37) (2008) 13871-6.
- [410] J. Gorman, A.J. Plys, M.L. Visnapuu, E. Alani, E.C. Greene, Visualizing one-dimensional diffusion of eukaryotic DNA repair factors along a chromatin lattice, *Nature structural & molecular biology* 17(8) (2010) 932-8.
- [411] S.C. Biddie, S. John, P.J. Sabo, R.E. Thurman, T.A. Johnson, R.L. Schiltz, T.B. Miranda, M.H. Sung, S. Trump, S.L. Lightman, C. Vinson, J.A. Stamatoyannopoulos, G.L. Hager, Transcription factor AP1 potentiates chromatin accessibility and glucocorticoid receptor binding, *Molecular cell* 43(1) (2011) 145-55.
- [412] Y. Chinenov, R. Gupte, I. Rogatsky, Nuclear receptors in inflammation control: repression by GR and beyond, *Molecular and cellular endocrinology* 380(1-2) (2013) 55-64.