



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

Análisis estructural y funcional del Receptor de Glucocorticoides en sus múltiples interacciones

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

Méd. NORMA ROXANA CARINA ALVES

Directora de Tesis: Dra. Adali Pecci

Co- Director de Tesis: Dr. Lautaro D. Álvarez

Consejero de Estudios: Dr. Ignacio E. Sánchez

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias - IFIBYNE-UBA-CONICET

Buenos Aires, 2023

RESUMEN

Análisis estructural y funcional del Receptor de Glucocorticoides en sus múltiples interacciones

En esta Tesis se exploran los mecanismos moleculares involucrados en la interacción entre el receptor de glucocorticoides (GR), un factor de transcripción activado por ligando, y varios de los interactores que participan en su actividad transcripcional. En primer lugar, se emplearon métodos computacionales (simulación por dinámica molecular) para descifrar los mecanismos de acción del agonismo y del antagonismo en el dominio de unión al ligando utilizando los compuestos comerciales dexametasona (glucocorticoide) y mifepristona (antiglucocorticoide), caracterizando el comportamiento dinámico de la hélice 12 del receptor y su relación con la identidad del ligando. En segundo lugar, se investigó la interacción del GR con corre reguladores de la transcripción mediante el uso de tecnología de *microarrays*, dirigido a evaluar afinidades de unión GR-corregulador en presencia de diferentes ligandos. Aplicando métodos de *docking* péptido-proteína también se analizaron los determinantes moleculares involucrados en este reconocimiento. En tercer y último lugar, se abordó el estudio de la interacción cruzada entre el GR y el receptor de progesterona (PR), factor de transcripción de la misma familia proteica. Empleando ensayos de genes reporteros, se evaluó la actividad transcripcional al activar cada receptor por separado o ambos a la vez, y se comprobó la interferencia funcional GR/PR. Luego, mediante microscopía de fluorescencia de alta resolución en células vivas, se estudió y corroboró la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo. Asimismo, se caracterizó el estado de oligomerización del GR en presencia de PR, observando también interferencia en este caso. En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que PR y GR podrían formar heterocomplejos. Finalmente, se realizó un estudio *in silico* del hipotético heterocomplejo mediante simulaciones por dinámica molecular de homo- y heterodímeros de los dominios de unión al ADN de PR y GR, corroborando su estabilidad estructural e identificando factores que podrían explicar su menor actividad transcripcional. El conjunto de los resultados obtenidos en esta Tesis permiten ampliar los conocimientos existentes sobre la estructura y función del receptor de glucocorticoides en diferentes contextos y en relación a los múltiples interactores que regulan su actividad: ligandos, corre reguladores y otros factores de transcripción y contribuyen a la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a las acciones fisiológicas y farmacológicas de los GC.

Palabras clave: glucocorticoides, receptor de glucocorticoides, simulación por dinámica molecular, corre reguladores, docking, microscopía de fluorescencia, receptor de progesterona.

ABSTRACT

Structural and functional analysis of the Glucocorticoid Receptor in its multiple interactions

This Thesis explores the molecular mechanisms involved in the interaction between the glucocorticoid receptor (GR), a ligand-activated transcription factor, and several interactors involved in its transcriptional activity. First, computational methods (molecular dynamics simulation) were employed to decipher the mechanisms of action of agonism and antagonism in the ligand binding domain using the commercial compounds dexamethasone (glucocorticoid) and mifepristone (antiglucocorticoid), characterizing the dynamic behavior of helix 12 of the receptor and its relationship with ligand identity. Second, the interaction of GR with transcriptional coregulators was investigated using a microarray assay, aimed at evaluating GR-coregulator binding affinities in the presence of different ligands. The molecular determinants involved in this recognition were also assessed by applying peptide-protein docking methods. Finally, the crosstalk between the GR and progesterone receptor (PR), a transcription factor of the same protein family, was addressed. Through reporter gene assays, transcriptional activity was evaluated by activating each receptor separately or simultaneously and functional GR/PR interference was confirmed. Using high-resolution fluorescence microscopy in live cells, the ability of both receptors to form part of the same complex was studied and corroborated. Likewise, the oligomerization state of GR in the presence of PR was characterized, and interference was observed. Taken together, these results reinforce the hypothesis that PR and GR can form heterocomplexes. Finally, an *in silico* study of the hypothetical heterocomplex was performed using molecular dynamics simulations of homo- and heterodimers of the DNA-binding domains of PR and GR, corroborating their structural stability and identifying factors that could explain their lower transcriptional activity. The set of results obtained in this Thesis extends the existing knowledge on the structure and function of the glucocorticoid receptor in different contexts and in relation to the multiple interactors that regulate its activity, including ligands, co-regulators, and other transcription factors, and contributes to the understanding of the molecular mechanisms underlying the physiological and pharmacological actions of GCs.

Keywords: glucocorticoids, glucocorticoid receptor, molecular dynamics simulation, coregulators, docking, fluorescence microscopy, progesterone receptor.

A Javier.
A mi familia.
A Adali, Lautaro y Virginia.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Hormonas esteroideas.....	10
1.1.2. Glucocorticoides.....	13
Funciones fisiológicas.....	13
Hipo e hipercortisolismo.....	16
Usos farmacológicos de los GCs.....	17
1.2 Receptores Nucleares. Receptores de Esteroides.....	18
1.2.1. Estructura general de los SR.....	19
1.3. El receptor de glucocorticoides (GR).....	22
Isoformas del GR humano.....	24
Complejo GR-chaperonas.....	26
Distribución nuclear del GR activo.....	27
1.3.1. Mecanismos de acción del GR.....	28
Modelo disociado.....	28
Modelos de acción del GR.....	31
1.3.2 Interactores del GR.....	33
Ligandos: agonistas/antagonistas.....	33
Correguladores.....	35
El receptor de progesterona (PR).....	36
1.4. Objetivos.....	37
CAPÍTULO 2 - Bases Moleculares del Agonismo/Antagonismo.....	39
Antecedentes.....	39
2.1 Modelos del cambio inducido/selección conformacional.....	40
2.2 Estructuras cristalográficas del GR.....	41
Resultados.....	44
2.3 Preparación de los sistemas.....	44
2.4 Simulación por MD clásica del GR LBD.....	48
2.4.1. Evaluación inicial de GR LBD no agonistas.....	48
2.4.2. Simulación de dinámica molecular clásica de sistemas GR LBD.....	50
2.4.3. Estabilidad y patrón de fluctuación de las trayectorias de cMD.....	50
2.4.4. Evolución de la conformación de la H12 en las trayectorias cMD.....	53
2.4.5. Modo de unión del ligando.....	59
2.5. Simulación por MD dirigida y Umbrella Sampling.....	62
2.5.1. Simulación por dinámica molecular dirigida.....	62

2.5.2. Umbrella Sampling.....	65
2.6. Conclusión.....	67
CAPÍTULO 3 - INTERACCIÓN CON CORREGULADORES.....	70
Antecedentes.....	70
3.1 Correguladores.....	70
Interacción entre el GR LBD y los correguladores.....	73
3.2. Microarreglos de péptidos MARCoNI.....	75
3.3. Análogos rígidos de glucocorticoides.....	76
Resultados.....	79
3.4. Dimensión del dominio AF-2 de GR LBD en simulaciones cMD.....	79
3.5. Estudio de la interacción del GR con correguladores mediante microarreglos de péptidos.....	81
3.6. Estudio de motivos de secuencia.....	85
3.7. Docking proteína-péptido. Rosetta FlexPepDock.....	87
3.8. Conclusión.....	93
CAPÍTULO 4 - INTERACCIÓN GR-PR.....	96
Antecedentes.....	96
4.1. Interacción entre el GR y otros SRs.....	96
Resultados.....	100
4.2 Actividad Transcripcional.....	100
4.3 Estado de oligomerización y capacidad de GR y PR de formar parte de un mismo complejo.....	107
Número y Brillo (Number & Brightness, N&B).....	107
Correlación cruzada de brillo (Cross-Correlation Brightness, Bcc).....	116
4.4 Análisis Estructural.....	118
4.5. Simulación por MD del DBD de ambos receptores.....	122
4.6. Conclusión.....	131
CAPÍTULO 5 - DISCUSIÓN.....	134
CAPÍTULO 6 - MÉTODOS COMPUTACIONALES y EXPERIMENTALES.....	145
6.1. Métodos computacionales.....	145
6.2. Métodos Experimentales.....	149
REFERENCIAS.....	162
AGRADECIMIENTOS.....	177

ABREVIATURAS

11 β -HSD1	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
11 β -HSD2	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
21-HS-6,19OP	21-hemisuccinoiloxi-6,19-epoxiprogesterona
21-HS-6,19OP	21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
AF-1	Dominio de Función de Activación 1
AF-2	Dominio de Función de Activación 2
ANOVA	Análisis de la Varianza
AP-1	Proteína Activadora 1
AR	Receptor de Andrógenos
Bcc	Correlación Cruzada de Brillo
cMD	Simulación por Dinámica Molecular Clásica
CoRNR	Cajas de Correpresores de Receptor Nuclear
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
CV	Variable Colectiva
DBD	Dominio de Unión al ADN
Dex	Dexametasona
DHT	Dihidrotestosterona
EGFP	Proteína Verde Fluorescente Incrementada
ER	Receptor de Estrógenos
FCCS	Espectroscopía de Correlación Cruzada de Fluorescencia
GBP	Transcortina
GC	Glucocorticoides
GFP	Proteína verde fluorescente
GR	Receptor de Glucocorticoides
GRE	Elemento de Respuesta a Glucocorticoides
HAT	Histona Acetiltransferasa
HDAC	Histona Desacetilasas

HE	Hormonas Esteroideas
HMT	Histona Metiltransferasa
HPA	Eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal
HRE	Elemento de Respuesta Hormonal
LBD	Dominio de Unión al Ligando
LBP	Bolsillo de Unión al Ligando
MARCoNI	<i>Microarray Assay for Realtime Coregulator-Nuclear receptor Interaction</i>
MD	Simulación Por Dinámica Molecular
MI	Índice de Modulación
MMTV	Promotor del Virus de Tumor Mamario de Ratón
MR	Receptor de Mineralocorticoides
NCoA	Coactivador Nuclear
NCoR	Correpresor Nuclear
NR	Receptor Nuclear
NTD	Dominio N-Terminal
PBD	Protein Data Bank
POMC	Proopiomelanocortina
PR	Receptor de Progesterona
PTMs	Modificaciones Post-Traduccionales
RMSD	Desviación Cuadrática Media
RMSF	Fluctuación Cuadrática Media
RU486	Mifepristona
SMD	Steered Molecular Dynamics
SR	Receptores de Esteroides
TF	Factor de Transcripción
US	<i>Umbrella Sampling</i>
ϵ	Brillo Real

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

La palabra “hormona” proviene del inglés *hormone*, y este del griego *hormôn*, “que impulsa”. Fue acuñada por E. H. Starling, W. B. Hardy y W. T. Vesey en 1905 y su definición actual es la siguiente: “Cualquiera de las sustancias producidas por células especializadas en órganos de estructura glandular o dispersas en otros tejidos, que circulan por la sangre y ejercen un efecto a distancia sobre un órgano o tejido blanco al interactuar con receptores específicos para ellas. El conjunto de órganos, tejidos y células especializadas en la producción de hormonas constituye el sistema endocrino” (de Terán Bleiberg, 2021). Fisiológicamente, entonces, las hormonas son moléculas efectoras que regulan la actividad de sus células blanco (y de los tejidos y órganos que conforman), con el objetivo último de mantener la homeostasis del organismo junto con la coordinación del crecimiento y el desarrollo corporales.

Desde un punto de vista químico, se las clasifica en cuatro grandes grupos: peptídicas, abarcando desde polipéptidos pequeños hasta proteínas; derivados de aminoácidos, como las catecolaminas, la melatonina o los derivados yodados de tirosina que conforman las hormonas tiroideas; gaseosas, incluidos el etileno (en vegetales) y el óxido nítrico; y lipídicas, dentro de las cuales encontramos a los derivados del ácido araquidónico y las hormonas esteroideas (Pawlina and Ross, 2015) .

1.1 Hormonas esteroideas

Los esteroides son moléculas orgánicas cuya estructura central es la del ciclopentanoperhidrofenantreno (**Figura 1.1**). El colesterol, principal esteroide en vertebrados, cumple diversas funciones: reguladoras, estructurales a nivel de las membranas celulares, y es además el sustrato inicial de la síntesis de compuestos tales como ácidos biliares y hormonas esteroideas (HE).

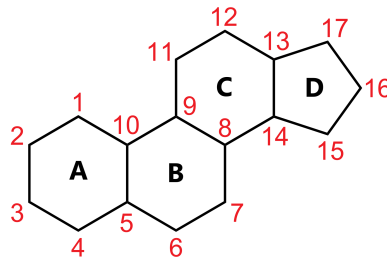


Figura 1.1. Estructura bidimensional del ciclopentanoperhidrofenantreno. Se numeran los carbonos y se indican con letras sus anillos.

En mamíferos, las HE comprenden cinco grandes grupos: andrógenos, estrógenos, progestágenos, mineralocorticoides y glucocorticoides. La biosíntesis de las HEs consiste en dos tipos de reacciones catalizadas enzimáticamente: deshidrogenaciones e hidroxilaciones (**Figura 1.2**). Los andrógenos, estrógenos y progestágenos, generalmente denominados hormonas sexuales, se secretan mayoritariamente en las gónadas, siendo la testosterona, el estradiol y la progesterona, respectivamente, los representantes más abundantes de cada familia en la circulación.

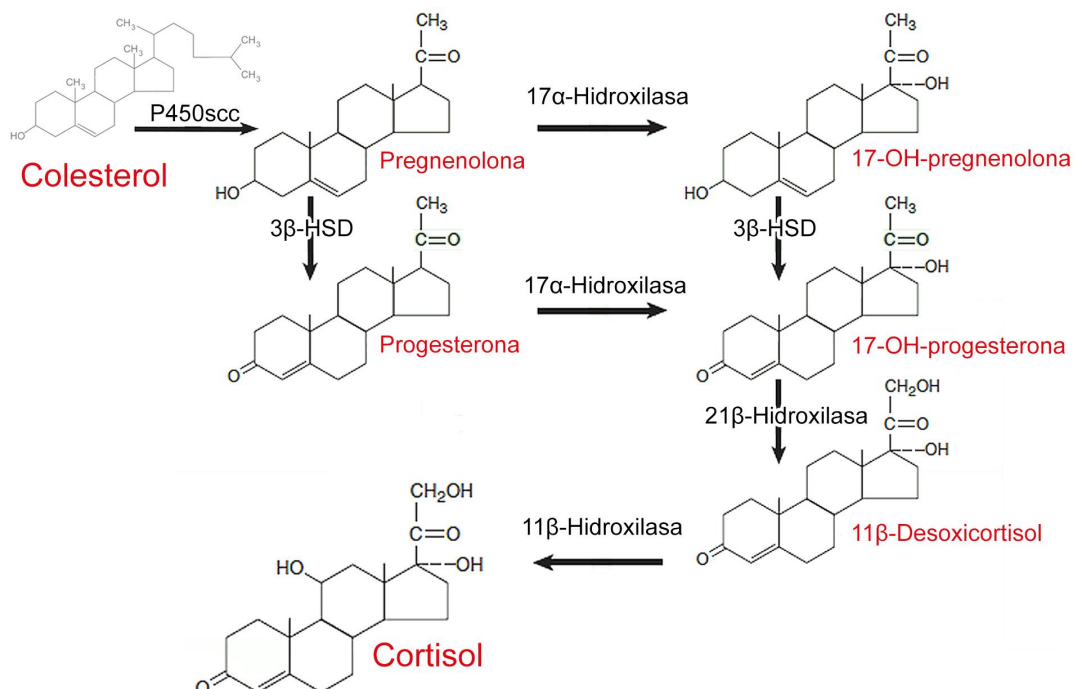


Figura 1.2. Biosíntesis de glucocorticoides en la zona fasciculada de la corteza de la glándula adrenal.

El estradiol se sintetiza a partir de la testosterona en el ovario. En la primera mitad del ciclo menstrual, regula la maduración folicular y la proliferación a nivel endometrial, y el aumento de los conductos galactóforos mamarios. Posterior a la ovulación, el cuerpo lúteo ovárico comienza la síntesis de progesterona, preparando el endometrio para una posible implantación embrionaria, junto con el crecimiento alveolar en las mamas. En caso de embarazo, el ovario continúa con su producción de progesterona hasta que la placenta se desarrolle y adquiera la capacidad de sintetizarla (Pawlina and Ross, 2015).

En el testículo, las células de Leydig producen testosterona y pequeñas cantidades de estrógenos. El andrógeno más potente, dihidrotestosterona (DHT), es producido por la acción de la enzima 5 α -reductasa, que se expresa además en órganos como el hígado, el cerebro, la piel y la próstata (Cole, Short and Hooper, 2019). Aunque el papel de andrógenos y estrógenos se asociaron fundamentalmente al desarrollo sexual, la evidencia actual revela que cumplen un rol clave en procesos tales como el mantenimiento de la salud ósea, el desarrollo muscular, el equilibrio entre masa grasa y magra corporales, la salud cardiovascular, el humor y la cognición (Nelson LR, 2001; Tyagi *et al.*, 2017).

En la glándula adrenal tiene lugar la síntesis de los últimos dos grupos de HE: glucocorticoides y mineralocorticoides. Como ambos se producen a nivel de la corteza, se los conoce globalmente como corticoesteroides o corticoides. En la zona más externa o glomerulosa se sintetiza el mineralocorticoide aldosterona, cuya función principal es la de la regulación del balance hidrosalino, la volemia y la osmolaridad plasmática, regulando de esta manera la presión arterial (Cole, Short and Hooper, 2019). Actúa a nivel renal, digestivo y del sistema nervioso central, y su síntesis y secreción están reguladas por el sistema renina-angiotensina-aldosterona .

Por último, en la zona fasciculada adrenal (pero también en órganos extrasuprarrenales como colon, timo y piel), tiene lugar la síntesis de los glucocorticoides (**Figura 1.2**), siendo el cortisol la principal hormona de esta familia en humanos.

1.1.2. Glucocorticoides

Celsus describió cuatro de los cinco signos cardinales de inflamación hace 2000 años, y Eustaquio descubrió las glándulas suprarrenales hace casi 500 años, pero no fue hasta 1936 cuando Selye notó que en ratas expuestas a estresores las glándulas suprarrenales estaban agrandadas y el timo y los ganglios linfáticos encogidos. La cortisona, el principio activo de las glándulas suprarrenales en roedores, fue aislada y caracterizada paralelamente por Kendall (Mason, Myers and Kendall, 1936; Mason, Hoehn and Kendall, 1938) y Reichstein (Reichstein, 1936; Reichstein and Shoppee, 1943) y se demostró su capacidad supresora de los órganos inmunitarios. Más adelante, Hench y colaboradores demostraron que la cortisona podía mejorar los síntomas de la artritis reumatoide (Hench and Kendall, 1949). Por su trabajo, en 1950 Kendall, Reichstein y Hench recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina (*The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1950*, no date; Melmed *et al.*, 2019).

Funciones fisiológicas

El cortisol es referido habitualmente como “la hormona del estrés”. En efecto, estresores sistémicos de diversos orígenes (trauma, infección, miedo, dolor, etc.) activan el eje neuroendocrino hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA) que, como ilustra la **Figura 1.3**, regula la liberación de cortisol: la secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRH) por parte del hipotálamo promueve la síntesis de la proopiomelanocortina (POMC), molécula precursora de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y la liberación de ésta desde la glándula pituitaria, lo que a su vez estimula la síntesis de cortisol y su liberación al torrente sanguíneo (Chrousos, 1995; Hartmann *et al.*, 2016; Nicolaides and Charmandari, 2021). En condiciones basales, la secreción circadiana y ultradiana de ACTH resulta en la producción rítmica y pulsátil de glucocorticoides endógenos (Kleiman and Tuckermann, 2007), con niveles circulantes altos por la mañana y bajos por la noche, participando además en la regulación del ciclo de sueño y vigilia (Nicolaides and Charmandari, 2021). En este contexto, el cortisol circulante elevado desempeñaría dos funciones principales: por

un lado, preparar al organismo para responder al factor estresante mediante el aumento de la disponibilidad de glucosa en sangre, la frecuencia cardíaca y respiratoria, la conciencia y agudeza neural; por otro, favorecer efectos supresores reguladores (inmunomoduladoras y antiinflamatorias) como mecanismo de defensa a los posibles efectos deletéreos para el organismo de una respuesta inmune e inflamatoria descontrolada (Chrousos, 1995; Hartmann *et al.*, 2016; Cole, Short and Hooper, 2019; Nicolaides and Charmandari, 2021). Los mecanismos subyacentes, sin embargo, no están del todo claros y están bajo estudio activo.

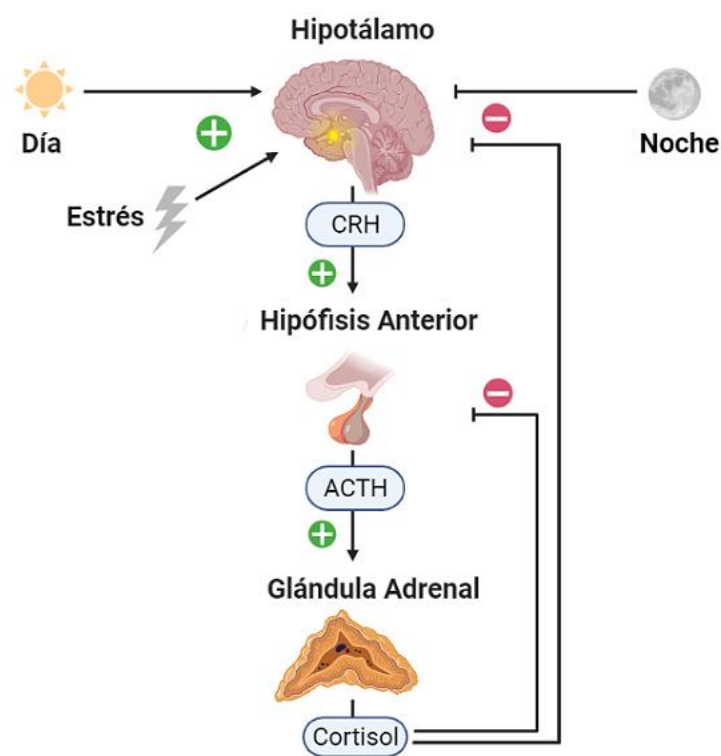


Figura 1.3. Eje Hipotálamo- Pituitario-Adrenal (HPA).

El cortisol regula también la homeostasis en reposo y del ritmo circadiano y juega un papel importante en varios momentos de la etapa fetal y de la vida adulta, influyendo en un amplio espectro de funciones fisiológicas (**Figura 1.4**): como hormona catabólica, estimula la degradación de proteínas en tejidos periféricos para liberar aminoácidos que pueden ser utilizados en el hígado en el proceso gluconeogénico y la liberación de ácidos grasos de los depósitos adiposos; estimula la síntesis de glucógeno en el hígado; participa en la

regulación del tono cardiovascular y del metabolismo óseo y también en procesos como la memoria, el comportamiento y la cognición (Hartmann *et al.*, 2016; Oprea *et al.*, 2019; Nicolaidis and Charmandari, 2021).

Finalmente, el cortisol juega un papel fundamental en el desarrollo fetal. Los niveles de cortisol de las glándulas suprarrenales fetales se elevan dramáticamente de cinco a seis semanas antes del nacimiento y juegan un papel crucial en las últimas etapas de la organogénesis (Cole, Short and Hooper, 2019), promoviendo la maduración de diversos órganos vitales como el cerebro, el hígado, los riñones, el timo, el tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio (Murphy *et al.*, 2006).

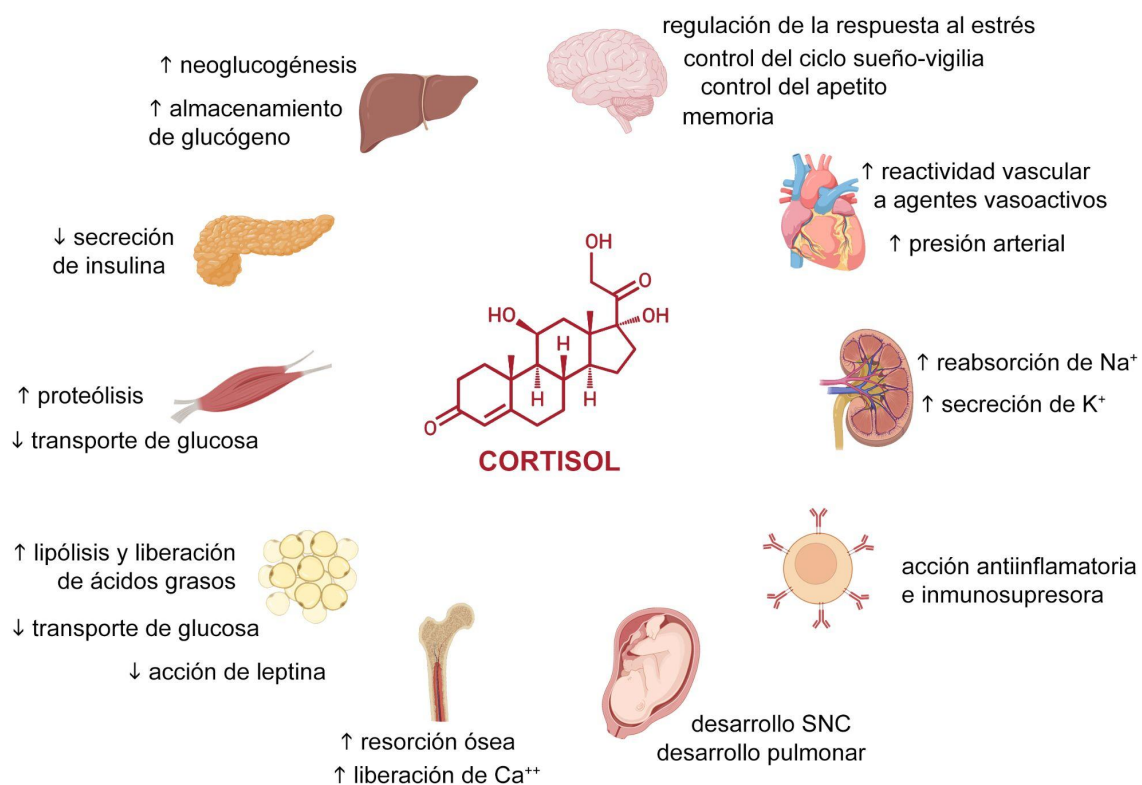


Figura 1.4. Principales efectos fisiológicos del cortisol en el organismo humano.

La acción de los GC está finamente controlada mediante diversos mecanismos. En primer lugar, el eje HPA regula positiva o negativamente la síntesis y liberación de GC al torrente sanguíneo, modificando su concentración plasmática (**Figura 1.3**). Por otro lado, los GC endógenos circulan mayormente unidos a proteínas transportadoras, tanto específicas (transcortina o *Glucocorticoid Binding Protein*, GBP) como inespecíficas

(albúmina). Una pequeña fracción (5%) lo hace de forma libre, y es la que se describe como fisiológicamente activa. Esta fracción libre está en última instancia determinada por el equilibrio entre la síntesis y liberación de GC a la sangre y la disponibilidad de proteínas transportadoras, constituyendo otro eslabón regulatorio de la actividad glucocorticoidea (van der Laan and Meijer, 2008; Cain and Cidlowski, 2015). Por último, la actividad intracelular de los GC está determinada por la acción de las enzimas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 y 2 (11 β -HSD1 y 11 β -HSD2). 11 β -HSD2 cataliza la conversión de cortisol a cortisona (con menor actividad glucocorticoidea), y 11 β -HSD1 lo hace de cortisona a cortisol. Los niveles de expresión y la actividad de estas enzimas son determinantes en la biodisponibilidad de los GC intracelulares y son específicos de cada tipo tisular. En efecto, en las células blanco de la aldosterona que expresan 11 β -HSD2 los niveles de cortisol (que posee efectos mineralocorticoides) se reducen (van der Laan and Meijer, 2008); mientras que en la placenta, 11 β -HSD2 inactiva los GC provenientes de la circulación materna evitando su acción directa sobre los órganos fetales en desarrollo (Murphy *et al.*, 2006).

Hipo e hipercortisolismo

El síndrome de Cushing es la expresión clínica del hipercortisolismo crónico de cualquier etiología, presentando signos y síntomas característicos: hiperglucemia, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2; aumento de peso y redistribución grasa en tronco y cara; atrofia y debilidad muscular por catabolismo proteico; disminución de la densidad ósea y osteoporosis; alteraciones dérmicas; hipertensión arterial y edema por acción directa sobre el receptor de mineralocorticoides (MR); susceptibilidad a infecciones y trastornos psiquiátricos, como depresión o psicosis (Nieuwenhuizen and Rutters, 2008; Granner, Wang and Yamamoto, 2015; Larry Jameson *et al.*, 2018; Niculet, Bobeica and Tatu, 2020).

El hipocortisolismo, por otro lado, cursa con fatiga, hipoglucemia e hipotensión arterial y su causa más común es la supresión del eje HPA por el uso crónico de GC exógenos. La interrupción brusca de la administración de GC puede generar un cuadro grave y

potencialmente mortal de insuficiencia suprarrenal aguda con hipotensión severa y *shock* (Larry Jameson *et al.*, 2018; Niculet, Bobeica and Tatu, 2020; Thau, Gandhi and Sharma, 2022).

Usos farmacológicos de los GCs

La aplicación farmacológica de los GC se estableció a fines de la década de 1940 cuando se reconocieron sus potentes efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, revolucionando el tratamiento de patologías inflamatorias como el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoidea, con un cambio radical en la sobrevida y prognosis de estas afecciones (Hartmann *et al.*, 2016). El subsiguiente desarrollo de GC sintéticos, como dexametasona y prednisolona, con potencia y eficacia muy superiores a las de los GC endógenos, los posicionaron como pilar terapéutico de una variedad de enfermedades inflamatorias y autoinmunes de muy difícil manejo hasta entonces, incluyendo esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, sarcoidosis y el síndrome nefrótico. Por otro lado, la administración de GC en altas dosis es de elección y de probada eficacia para eventos inflamatorios agudos potencialmente mortales como shock, edema cerebral o enfermedad de injerto contra huésped. Por último, sus propiedades inmunosupresoras se aprovechan para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas linfoproliferativas que abarcan diversos tipos de leucemias y linfomas (Cain and Cidlowski, 2015).

Sin embargo, rápidamente quedó en evidencia que las dosis farmacológicas de GC en tratamientos prolongados, incluso en aplicaciones tópicas, conllevan una exacerbación descontrolada de los efectos metabólicos propios de los GC, con el consecuente desarrollo de un síndrome de Cushing iatrogénico (**Figura 1.5**), limitando su uso clínico crónico.

No obstante, su innegable poder terapéutico impulsó una intensa investigación con el fin último de desarrollar nuevos GC sintéticos que puedan disociar los efectos terapéuticos de los adversos: una tarea a la vez prometedora y desafiante que exige desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes a las acciones fisiológicas y farmacológicas de los GC.

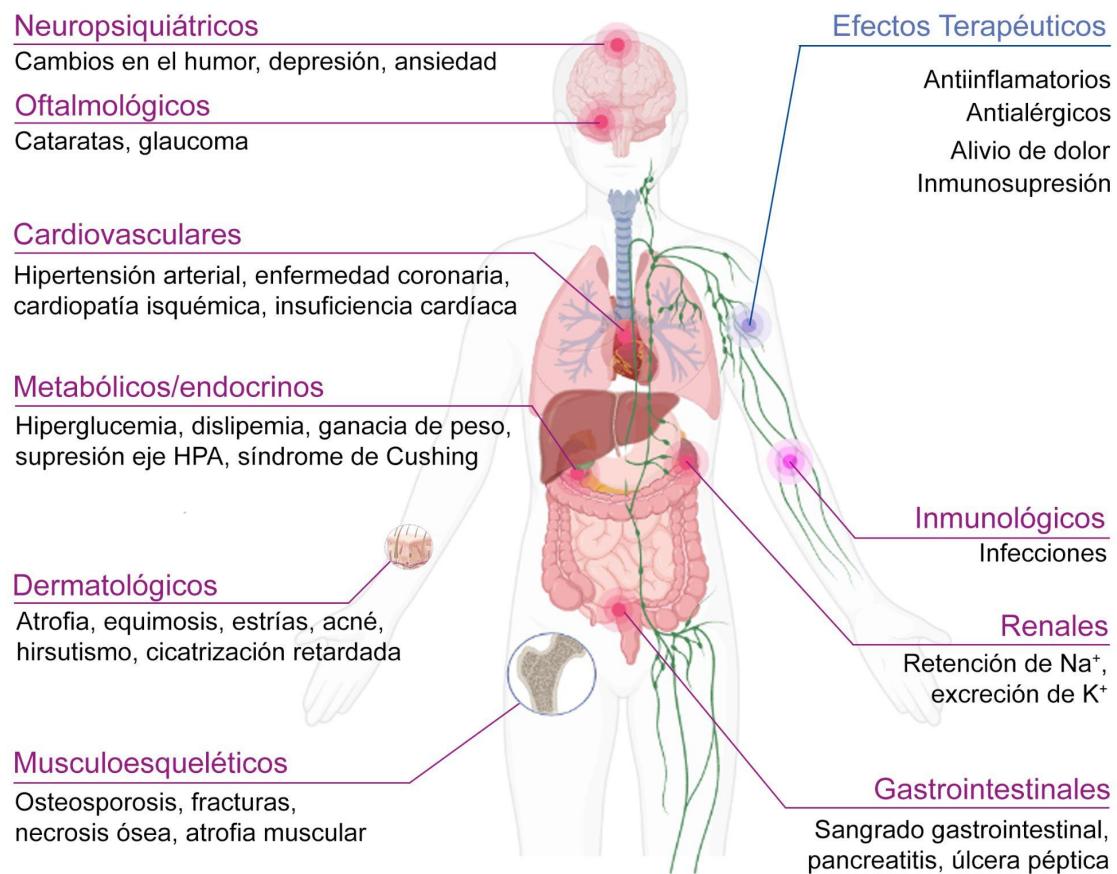


Figura 1.5. Efectos terapéuticos (azul) y adversos (violeta) del uso farmacológico de GC.

1.2 Receptores Nucleares. Receptores de Esteroides

La superfamilia de receptores nucleares (NR) está compuesta por factores de transcripción activados por ligandos, cuya función última es la transducción de las señales mediadas por diferentes hormonas (entre las que se encuentran las hormonas esteroideas, tiroideas y retinoideas) en las distintas respuestas fisiológicas correspondientes. Por otro lado, dentro de esta familia también se han descrito los llamados receptores nucleares "huérfanos", para los que hasta la fecha no se han identificado ligandos endógenos (Lonard and O'Malley, 2012; Weikum, Liu and Ortlund, 2018; Tao *et al.*, 2020).

La familia de NR cuenta con 48 miembros, que se clasifican en subgrupos según sus ligandos y mecanismos de acción. Entre ellos se encuentra el subgrupo de receptores de esteroides (SR) que comprende 6 miembros evolutivamente relacionados: el receptor de andrógenos (AR), de progesterona (PR), de glucocorticoides (GR), de mineralocorticoides (MR), y dos receptores de estrógenos (ER α y ER β) (Thornton, 2001; Thornton, Need and Crews, 2003). Los SR controlan una gran cantidad de procesos metabólicos, reproductivos y de desarrollo y están a su vez regulados, como mencionamos, por la unión directa de sus correspondientes hormonas esteroideas. (Lonard and O'Malley, 2012; Weikum, Liu and Ortlund, 2018).

1.2.1. Estructura general de los SR

Como consecuencia de su relación evolutiva, los SR presentan una alta similitud de secuencia entre sus dominios (Bledsoe, Stewart and Pearce, 2004), en especial aquellos a través de los cuales interactúan con el ADN o con sus ligandos. Puntualmente, la similitud estructural del dominio de unión al ligando es el origen de las numerosas reacciones cruzadas descritas entre los distintos SR y sus hormonas endógenas, y es esta promiscuidad entre ligandos y receptores esteroideos uno de los múltiples obstáculos en el desarrollo de fármacos específicos para cada SR en particular. Por otro lado, sin embargo, esta característica puede resultar beneficiosa para otros abordajes terapéuticos a través del diseño de ligandos de acción múltiple o *multitarget* (Morphy, Kay and Rankovic, 2004; Hopkins, Mason and Overington, 2006; Proschak, Stark and Merk, 2019; Medvedev *et al.*, 2022).

Clásicamente, los SR se describen como proteínas globulares, modulares, organizadas en cinco dominios bien diferenciados. Se los designa, desde su extremo N-terminal, con las letras A, B, C, D, y E; la excepción es el ER α , que presenta además un breve dominio F C-terminal (**Figura 1.6**). Cada uno de estos subdominios posee una arquitectura particular y juega un papel específico en la biología del receptor. Sus características generales se describen brevemente a continuación.

A/B: dominio N-terminal (*N-terminal domain*; NTD). El NTD es un dominio intrínsecamente desordenado. Entre los SR, el NTD está muy poco conservado y su tamaño presenta gran disparidad. Contiene la región de función de activación 1 (*Activation Function-1*; AF-1) independiente de ligando, que interactúa con proteínas co-reguladoras, específicas para cada célula y cada promotor. Contiene numerosos sitios blanco de modificaciones post-traduccionales (PTMs).

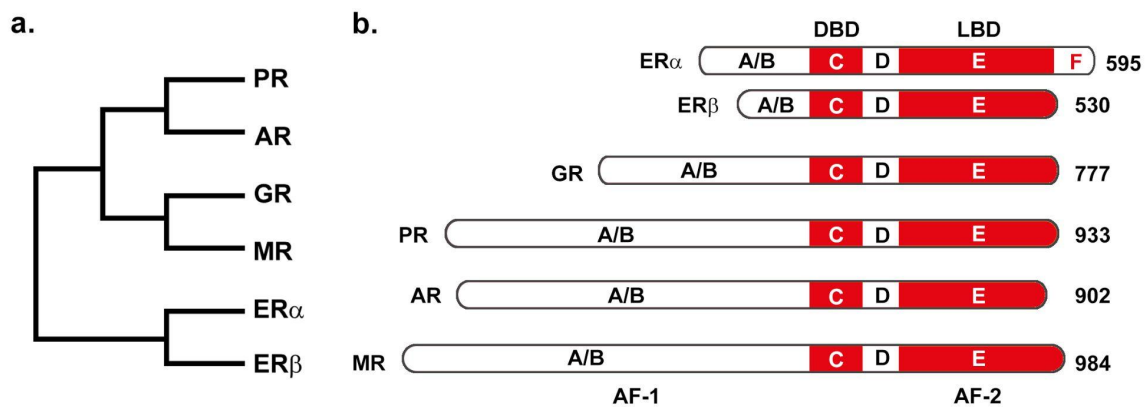


Figura 1.6. Relación evolutiva y comparación estructural de la familia SR. **a.** Árbol filogenético simplificado de la familia de los SR. **b.** Esquema comparativo de los dominios de los SR. Los números representan la longitud del receptor en aminoácidos. Adaptado de (Griekspoor *et al.*, 2007; Okafor *et al.*, 2020).

C: dominio de unión al ADN (*DNA Binding Domain*; DBD). Esta región es la de mayor conservación entre los SR. El DBD posee dos subdominios, cada uno con una estructura de dedo de zinc de unión al ADN seguido de una hélice anfipática y un *loop* (**Figura 1.7**). La hélice del primer subdominio, H1 o de lectura de ADN, interactúa con el surco mayor del ADN para realizar interacciones específicas, mientras que el *loop* (proximal o *P-loop*) participa en el reconocimiento de secuencias de ADN. Por su parte, la hélice H2 hace contactos no específicos con el esqueleto del ADN y el *loop* distal o *D-loop* contiene residuos que participan en la dimerización del receptor.

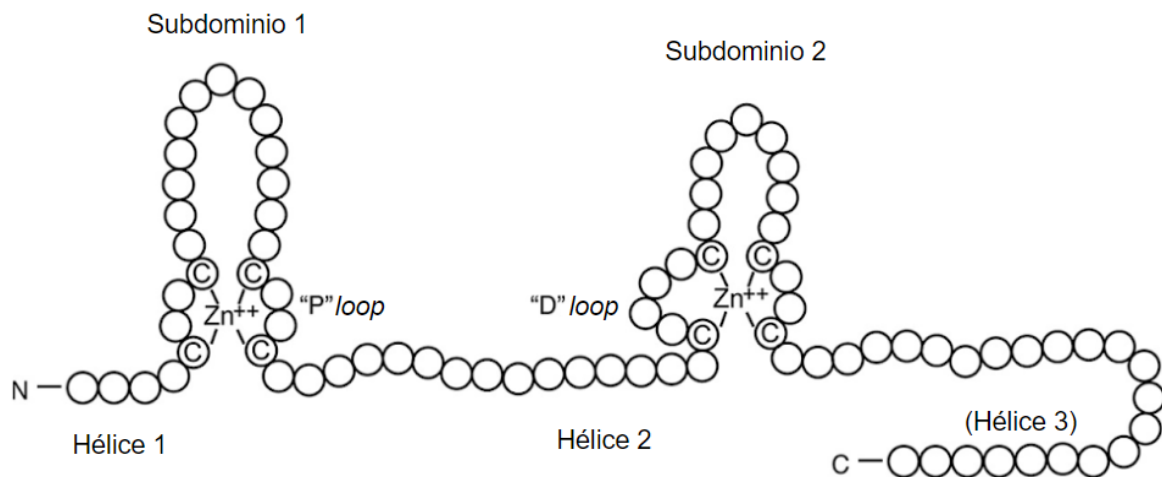


Figura 1.7. Representación esquemática del DBD de los SR. Se indican los subdominios y sus estructuras principales. Modificado de (Weikum, Liu and Ortlund, 2018).

D: Región bisagra (*Hinge*). La región bisagra es un enlace corto y flexible entre el DBD y el dominio de unión al ligando. Tiene la menor conservación de secuencia y de tamaño entre los receptores esteroideos. Es un sitio para PTMs regulatorias y puede contener una señal de localización nuclear.

E: dominio de unión al ligando (*Ligand Binding Domain; LBD*). Es un dominio de señalización alostérico complejo, que no solo se une a ligandos sino que también interactúa directamente con proteínas co-reguladoras. Contiene comúnmente 11 hélices- α y cuatro hojas- β , plegadas en tres capas paralelas formando un sándwich alfa-helicoidal (**Figura 1.8**). Esto crea un bolsillo hidrofóbico de unión a ligando (*Ligand Binding Pocket; LBP*) en la base del receptor. Si bien el LBD es estructuralmente conservado, la región del LBP es la más variable entre los SR. Esta diversidad estaría asociada a cierta especificidad en el reconocimiento de ligandos. Por último, el LBD contiene otra superficie de función de activación (*Activation Function-2; AF-2*), formada por las hélices 3, 4 y 12, y que interactúa con diferentes proteínas co-reguladoras.

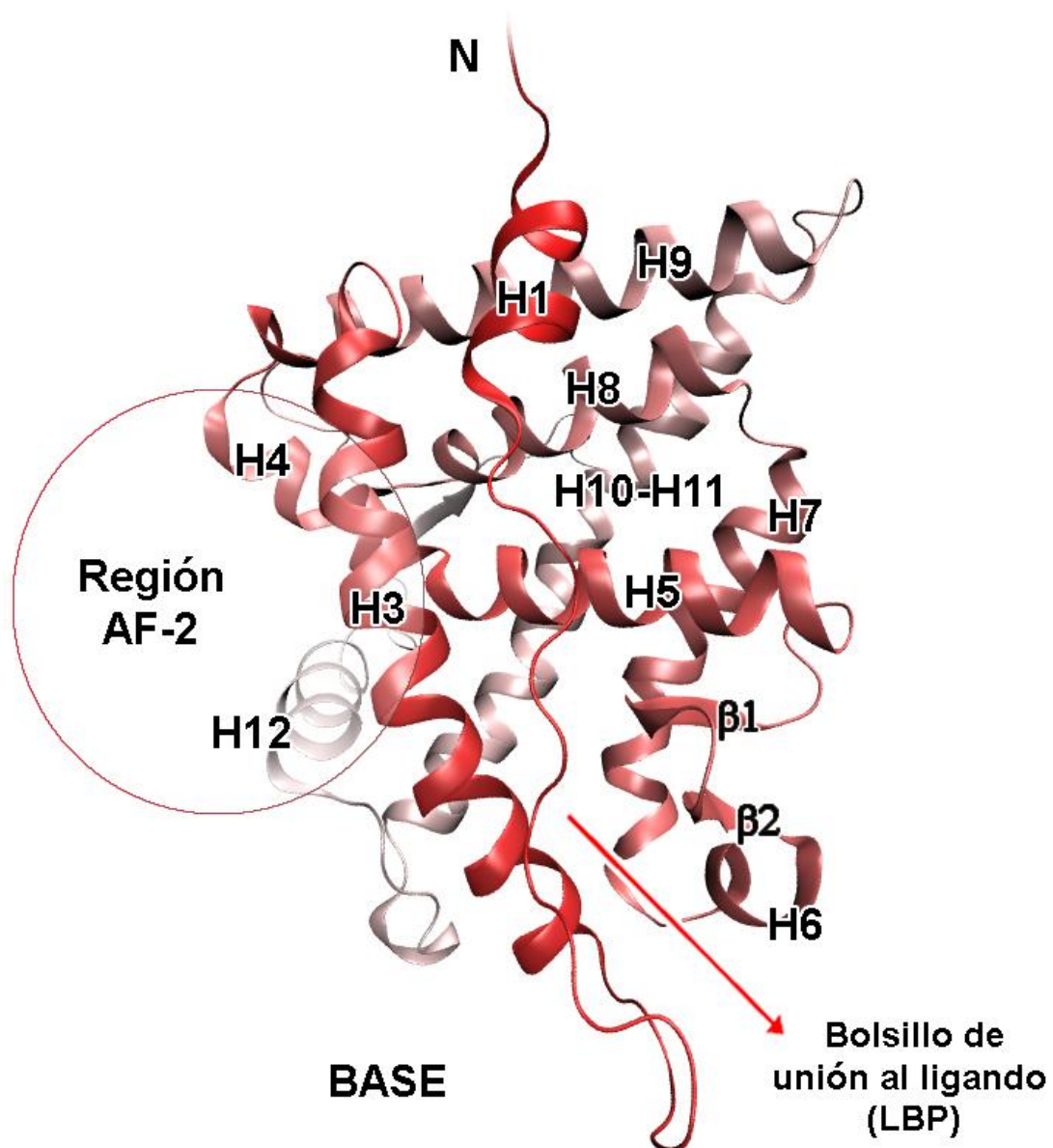


Figura 1.8. Dominio LBD de los SR. Se indican las hélices- α y hojas- β con su numeración y las estructuras principales del SR LBD. (GR; PDB ID: 1m2z). Basado en (Weikum, Liu and Ortlund, 2018).

1.3. El receptor de glucocorticoides (GR)

Por sus características lipofílicas, los GC libres circulantes ingresan a la célula blanco por difusión a través de la membrana plasmática. Una vez en el citoplasma, ejercerán su acción específica a través de su interacción con el GR. En humanos, el GR se expresa de manera ubicua.

Como miembro de la familia de receptores esteroideos, el GR es un factor de transcripción que exhibe la estructura modular arriba descripta. En la **Figura 1.9** se muestra una representación esquemática de sus dominios, indicando el número del aminoácido que separa cada dominio, siguiendo la numeración correspondiente al GR humano. En la parte superior se representan en círculos de colores los sitios plausibles de modificaciones postraduccionales, donde cada letra identifica un tipo particular de PTMs (P: fosforilación, S: sumoilación, U: ubiquitinación, A: acetilación). Por último, las barras de la parte inferior indican las regiones de función de activación 1 y 2 (AF-1 y AF-2), las regiones de dimerización y aquellas con función de localización nuclear. La longitud de las barras corresponde a la de las regiones representadas en aminoácidos. Las características particulares de los dominios de unión al Ligando (LBD) y al ADN (DBD) del GR serán descriptas y analizadas en detalle en los capítulos 2 y 4, respectivamente.

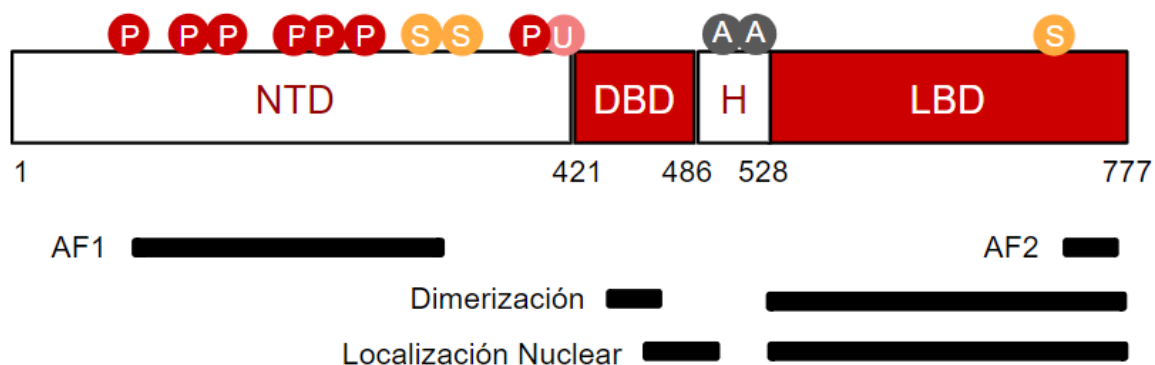


Figura 1.9. Dominios estructurales del GR humano. NTD: dominio N-terminal, DBD: dominio de unión al ADN, H: región bisagra, LBD: dominio de unión al ligando. P: fosforilación, S: sumoilación, U: ubiquitinación, A: acetilación. Modificado de (Cain and Cidlowski, 2015).

Las respuestas desencadenadas por su unión a GC son específicas y características para cada tipo celular. La regulación de tal especificidad de acción es compleja y todavía no bien dilucidada. Sin embargo, se reconocen por lo menos dos mecanismos involucrados: por un lado, la presencia de isoformas del GR, con acciones diferentes y en concentraciones relativas características de cada tipo celular; por otro, la interacción con diversos correguladores, cuyos niveles de expresión son también específicos de cada tipo celular. La estructura y función de los correguladores del hGR se describen más adelante en este capítulo y serán tratados en detalle en el Capítulo 3. A continuación, se describen brevemente las variantes de hGR.

Isoformas del GR humano

El hGR es codificado por el gen NR3C1 ubicado en el cromosoma 5 (5q31.3) y contiene 10 exones. El exón 1 no se expresa y contiene múltiples sitios reguladores que influyen en la expresión de NR3C1 positiva o negativamente. Los exones 2-9 α /9 β contribuyen a la expresión del hGR (**Figura 1.10**). El uso alternativo de los exones 9 α o 9 β produce las dos principales isoformas de este receptor: hGR α y hGR β (Cain and Cidlowski, 2015). El GR α humano (hGR α) es un polipéptido de 777 aminoácidos que se expresa en casi todas las células y se localiza predominantemente en la región citoplásmica de la célula blanco. Es capaz de unir glucocorticoides naturales (cortisol) y análogos de glucocorticoides sintéticos, y es responsable de las acciones génicas de los GC mencionadas anteriormente. Por otro lado, el hGR β se expresa en muchos tipos de células, incluidos osteoclastos, osteoblastos, osteocitos, células epiteliales y neutrófilos. Se describió inicialmente como un péptido inhibidor de la actividad transcripcional del hGR α , dominante negativo (a altas concentraciones de GC). Existe evidencia que indica que esta isoforma está involucrada en la transducción de señales de genes no sensibles a la regulación GR α (Cain and Cidlowski, 2015).

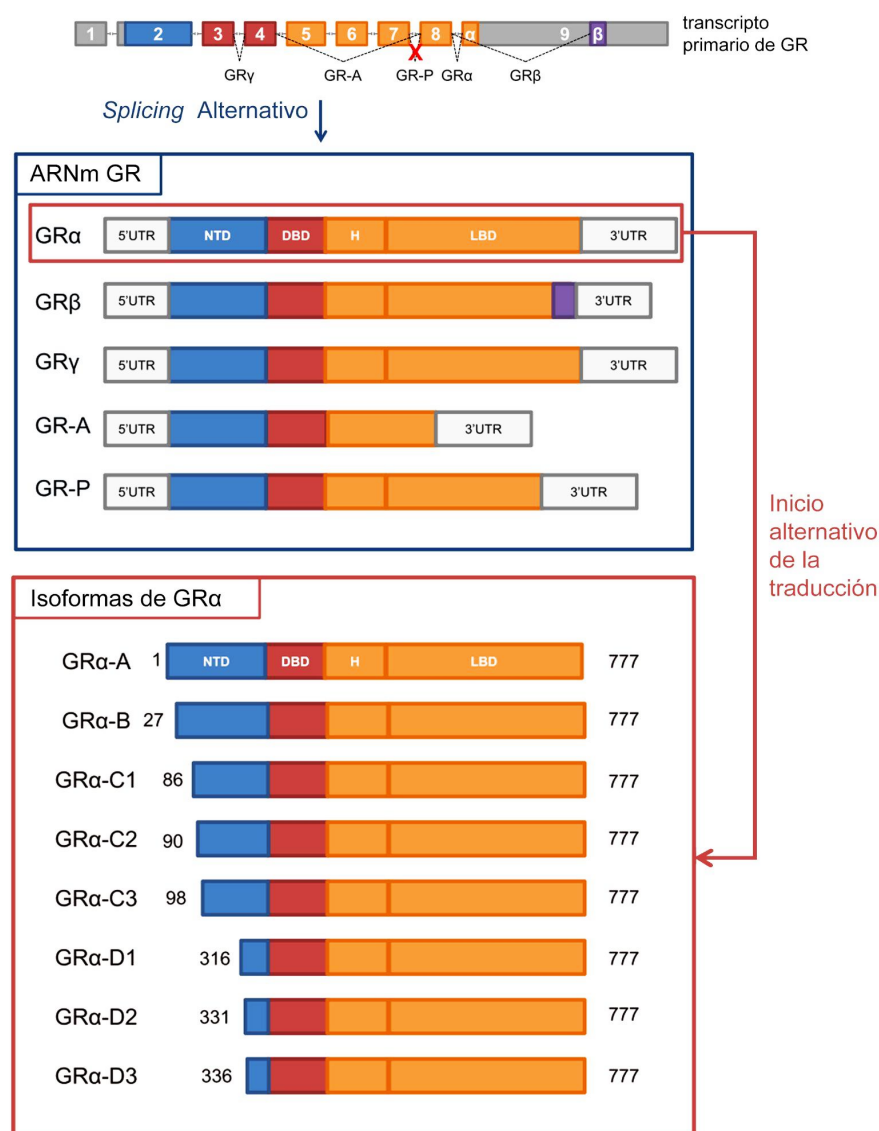


Figura 1.10. Generación de las diversas isoformas del GR por *splicing* alternativo y sitios de inicio de la traducción. Modificado de (Cain and Cidlowski, 2015).

Además de estas dos isoformas proteicas, Lu y Cidlowski demostraron la existencia de ocho isoformas de GR α adicionales (hGR α -A, hGR α -B, hGR α -C1, hGR α -C2, hGR α -C3, hGR α -D1, hGR α -D2 y hGR α -D3; **Figura 1.10**), que se generan mediante iniciaciones alternativas de la traducción del ARNm de GR α (Lu and Cidlowski, 2005). Estas isoformas tienen dominios N-terminales progresivamente más cortos y diferentes propiedades en términos de localización subcelular, expresión y función. En este trabajo de tesis, se estudió la isoforma GR α -A, y a menos que se indique lo contrario será referida por simplicidad como GR.

Complejo GR-chaperonas

En ausencia de ligando, GR se localiza predominantemente en el citoplasma asociado a un complejo multimérico compuesto por diversas proteínas, tales como las chaperonas hsp90, hsp70, hsp40 y miembros de la familia de inmunofilinas FK506 (FKBP51 y FKBP52). Las chaperonas Hsp70 y Hsp90 son esenciales para el correcto mantenimiento del proteoma celular, participando en el plegamiento, maduración, activación y tráfico de proteínas “clientes”, como los SR. Las inmunofilinas, por su parte, participan y regulan la interacción del complejo con proteínas motoras del sistema de movimiento retrógrado hacia el núcleo celular, promoviendo la translocación nuclear del GR activado (Pratt *et al.*, 2004; Galigniana *et al.*, 2012; Hessenkemper and Baniahmad, 2012; Wang *et al.*, 2022).

Este heterocomplejo GR-Chaperonas es dinámico y cíclico, con una intervención secuencial coordinada de las distintas proteínas participantes, modulando finamente la actividad transcripcional del GR mediante un proceso sucesivo de activación e inactivación del receptor. De forma simplificada, se puede describir el ensamblado del complejo GR-Chaperonas como un ciclo de cuatro pasos (Kirschke *et al.*, 2014; Noddings *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022), como se ilustra en la **Figura 1.11**.

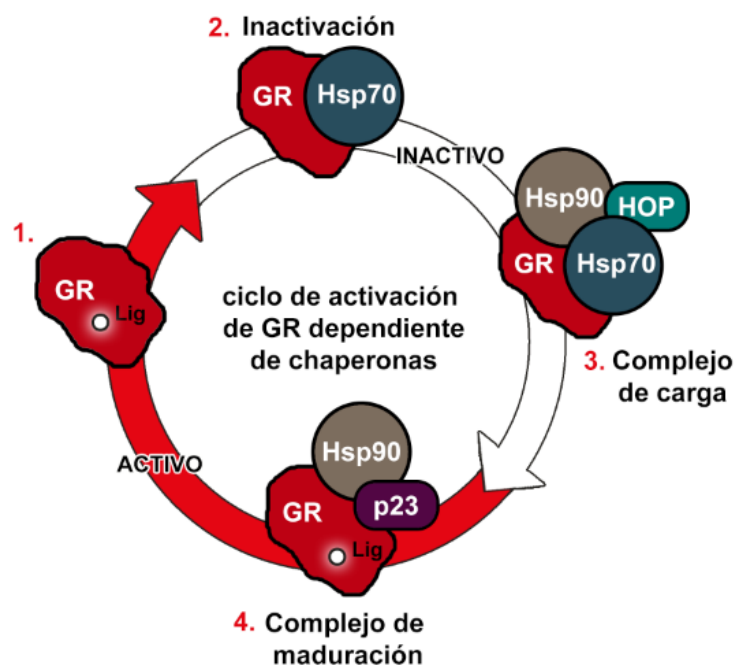


Figura 1.11. Modelo simplificado del ensamblado del heterocomplejo GR-chaperonas. Adaptado de (Wang *et al.*, 2022).

En primer lugar, el GR activo (completamente plegado y unido a ligando; **Figura 1.11.1**) es captado e inactivado por la Hsp70 (**Figura 1.11.2**), desplegando parte de la proteína y liberando el ligando de su sitio de unión. Luego, la co-chaperona Hop (*Hsp70-Hsp90 Organizing Protein*, proteína organizadora de Hsp90-Hsp70) ayuda a cargar el complejo Hsp70-GR LBD sobre Hsp90, formando el “complejo de carga de cliente” inactivo (GR LBD-Hsp90-Hsp70-Hop; **Figura 1.11.3**). Impulsados por la unión e hidrólisis del ATP por Hsp90, se liberan Hsp70 y Hop del complejo de carga y se incorpora p23, formando el “complejo de maduración del cliente” GR LBD-Hsp90-p23 (**Figura 1.11.4**). En dicho complejo, GR sufre un replegado parcial, adquiriendo la capacidad de unir al ligando con alta afinidad. En última instancia, la unión del ligando al GR induce, por un lado, un cambio conformacional del receptor adquiriendo un estado plegado nativo; por otro, remodela el complejo multiproteico hacia una configuración que favorece la translocación de GR al núcleo para ejercer su acción sobre la actividad transcripcional.

Distribución nuclear del GR activo

El núcleo es una organela compleja organizada en múltiples subcompartimentos carentes de membrana, cuyos componentes presentan un intercambio dinámico. En este sentido, la distribución subnuclear del GR no es homogénea, sino que se concentra en 1000-2000 dominios focales o *foci*, con decenas de moléculas de GR por focus (van Steensel *et al.*, 1995). Por otro lado, ligandos con mayor afinidad por el GR favorecen conformaciones del receptor con una mayor capacidad de reclutamiento a los foci (Schaaf, Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2005). Resultados recientes sugieren que la formación de *foci* de GR requiere una interacción inicial con ciertas regiones de la cromatina y de un proceso de separación de fases líquido-líquido con un papel funcional potencialmente relevante en la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides (Stortz *et al.*, 2020). La distribución y características de *foci* de GR en distintos contextos será estudiada en el capítulo 4 de este trabajo.

1.3.1. Mecanismos de acción del GR

Las acciones del GR se clasifican en genómicas y no genómicas, que si bien su estudio fue en un principio abordado en forma independiente, hoy se sabe que ambas se relacionan e influyen mutuamente. Las acciones no genómicas engloban aquellos efectos de acción rápidos de los GC, independientes de la función de GR como TF y no fueron estudiados en esta tesis, por lo que no serán abordados aquí. Nos centraremos entonces, en los efectos del GR en la regulación de la expresión génica.

Las numerosas redes metabólicas en las que participa el GR comprenden intrincados procesos de señalización e interacción moleculares simultáneos, donde sus mecanismos subyacentes se revelan cada vez más complejos, y su estudio, desafiante. En consecuencia, a pesar de intensas décadas de estudio, aún no hay un consenso general en un modelo único para describir las acciones del GR, sino una superposición de diversos paradigmas nuevos y antiguos.

A continuación, discutiremos primero el histórico *modelo disociado* de acción de GR, su origen, inconsistencias y la necesidad de su reemplazo, para luego presentar las ideas emergentes de la *era genómica*.

Modelo disociado

El modelo disociado propone dos mecanismos de acción de GR. Por un lado, en la denominada *transactivación*, el GR activado transloca al núcleo celular e induce la expresión génica por un mecanismo directo de unión al ADN en regiones blanco denominadas GRE (*Glucocorticoid Response Elements*, Elementos de Respuesta a GC) en forma de homodímeros (**Figuras 1.12 y 1.13.a**) (Clark, 2007). Por otro lado, en el mecanismo de *transrepresión*, el GR unido a ligando interactúa como monómero con otros TF e inhibe la expresión de genes activados por dichos factores por un mecanismo indirecto, es decir, sin unión al ADN (**Figuras 1.12 y 1.13.a**).

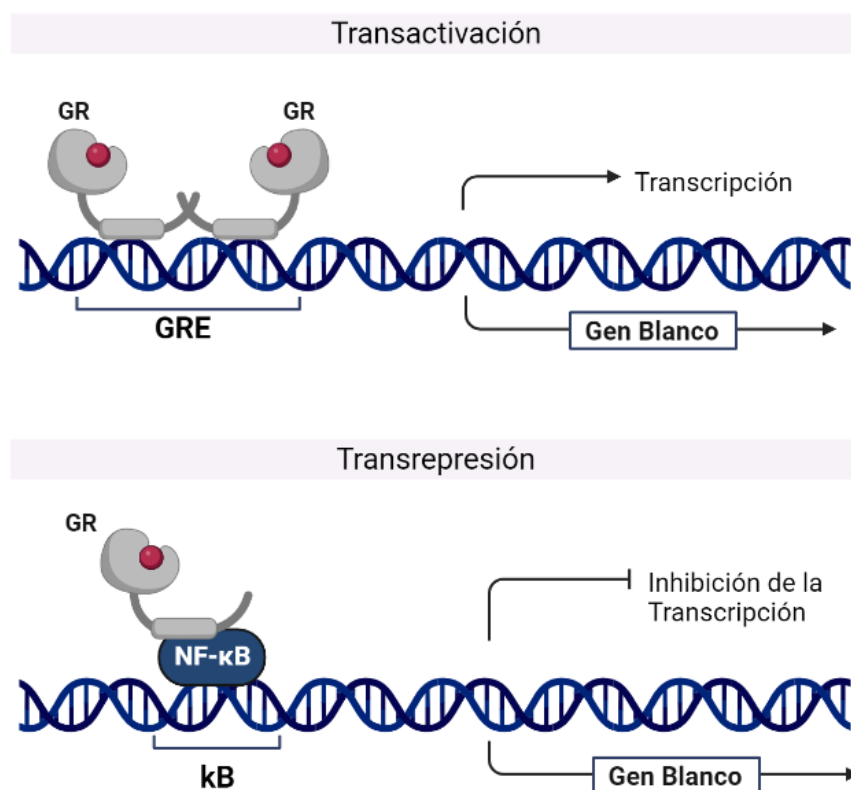


Figura 1.12. Mecanismos de acción de GR propuestos por el modelo disociado.

Este modelo se desarrolló a partir del estudio y caracterización de la mutante A458T del GR humano (A477T en rata y A465T en ratón) (Beck, De Bosscher and Haegeman, 2011), conocido como GRdim (Reichardt *et al.*, 1998). Los investigadores determinaron que GRdim no se une al ADN ni forma homodímeros; por otro lado, observaron que no induce efectos metabólicos, pero tiene capacidad de reprimir la expresión de genes regulados por AP-1 y NFκB a través de interacciones con estos TF, con efectos inmunomoduladores (Heck *et al.*, 1994). De estas observaciones, los autores concluyeron que GRdim actúa como monómero, que interactúa con otros TF sin unión directa al ADN y finalmente, que tiene mayoritariamente efectos inmunomoduladores pero no metabólicos. En consecuencia, se asoció la *represión génica* a los efectos inmunomoduladores del GR y se estableció que este mecanismo (*transrepresión*) involucraría una acción del GR monomérico sin interacción con el ADN.

En concordancia con estos los resultados, en el estudio de ratones mutantes *knock-in* GR^{dim/dim} se observó la inhibición de la inducción de genes involucrados en procesos

metabólicos, mientras que los efectos inmunomoduladores de los GC se mantenían conservados (Reichardt *et al.*, 1998, 2001). En consecuencia, se aceptó que los genes regulados por el mecanismo de transactivación estarían asociados a los efectos metabólicos de los GC (es decir, clínicamente adversos o indeseables), mientras que los genes regulados por transrepresión se asociaban a efectos antiinflamatorios e inmunosupresores (farmacológicamente deseados) (Clark, 2007).

Sobre la premisa de que los cambios conformacionales derivados de una mutación puntual en el receptor, como A458T en el GRdim, disociaría los mecanismos de transrepresión y transactivación del GR, se instauró la idea de que un ligando que emulara tales reorganizaciones estructurales tendría también un efecto terapéutico disociado (Clark and Belvisi, 2012), manteniendo los efectos antiinflamatorios benéficos e idealmente sin desencadenar los adversos: el GC ideal (Rosen and Miner, 2005).

Sin embargo, la evidencia actual acumulada muestra que el modelo disociado representa una sobresimplificación de los complejos mecanismos que regulan la acción del GR y que las bases sobre las que se erigió serían imprecisas. En efecto, la asociación lineal de transrepresión con inmunomodulación y transactivación con efectos metabólicos adversos resulta inexacta, observándose entrecruzamientos entre ambos mecanismos (**Figura 1.13.b**) (Schäcke, Döcke and Asadullah, 2002; Vandevyver *et al.*, 2013; Hübner *et al.*, 2015).

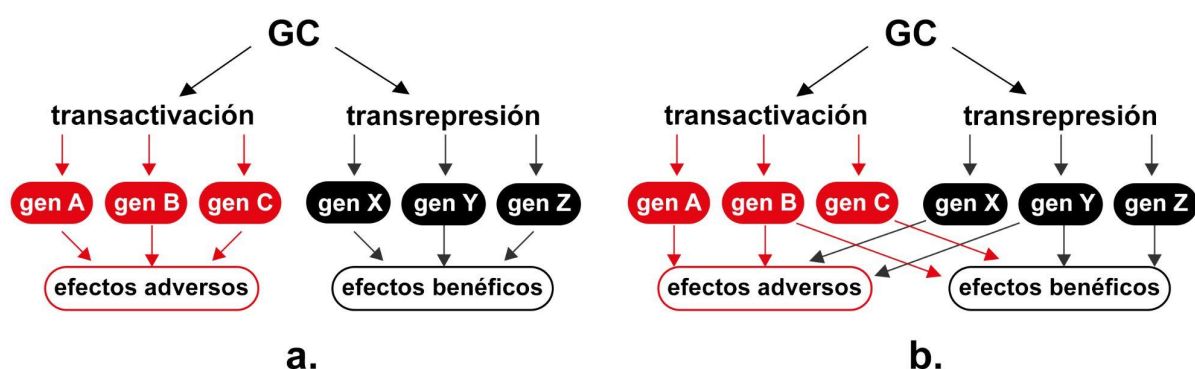


Figura 1.13. Mecanismos de acción de los efectos secundarios y antiinflamatorios de los GC. **a.** Según el modelo disociado. **b.** Observación experimental. Modificado de (Clark, 2007).

Por otro lado, trabajos posteriores han demostrado que en determinado contexto celular y para ciertas regiones GRE presentes en genes blanco del receptor, el GRdim es capaz de inducir la expresión génica, cuestionando así la imposibilidad del GRdim a unirse al ADN y de transactivar (Rogatsky *et al.*, 2003; Meijsing *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2013). Asimismo, varios grupos de investigación han comprobado que el GRdim forma homodímeros en los núcleos de células vivas, al igual que el receptor salvaje (Jewell *et al.*, 2012; Presman *et al.*, 2014). Considerando entonces que GRdim no carece de capacidad de formar dímeros y que no hay correlación directa entre el estado de oligomerización y la función transcripcional del receptor (Presman *et al.*, 2014), los resultados obtenidos durante la caracterización de este receptor mutante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, están siendo reinterpretados.

Por último, destacamos que la aplicación de este modelo reduccionista puede resultar un sesgo en la misma empresa que en un principio generó su desarrollo: la búsqueda de nuevos GC con efectos antiinflamatorios y mínimos efectos adversos. En efecto, la evaluación de fármacos en tanto su respuesta biológica los redujo a las categorías mínimas de transactivadores o transrepresores, perdiendo de vista la posible función terapéutica de aquellos compuestos que transactivaran genes implicados en la regulación de inflamación e inmunidad (De Bosscher *et al.*, 2008).

Modelos de acción del GR

El modo de interacción de GR con el ADN es aún hoy objeto de intenso debate. En la **Figura 1.14** se ilustran algunos de los modelos de interacción GR-ADN actualmente propuestos en la literatura. El mecanismo de activación de la transcripción mediada por GR es usualmente descrito de manera similar a la del modelo disociado, donde un dímero de GR se une a un sitio GRE (**Figura 1.14.a**) (Gerber, Newton and Sasse, 2021; Butz and Patócs, 2022; Vettorazzi *et al.*, 2022), aunque estudios recientes han demostrado que el GR puede unirse al ADN en forma de tetrámero (**Figura 1.14.b**) (Presman *et al.*, 2016; Paakinaho *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2021). Por otro lado, también se ha propuesto la interacción de GR con otros TF sobre los denominados “sitios compuestos” formados por

un sitio GRE y un sitio de unión de otro TF, interactuando así con dicho TF para favorecer o inhibir la transcripción (**Figura 1.14.c**) (Vettorazzi et al. 2022). Los modelos de inhibición de la transcripción mediada por GR, en cambio, son más abundantes. Si bien todavía hay trabajos que citan al modelo disociado, la evidencia actual indica que los monómeros de GR tendrían escasa relevancia transcripcional y que la interacción directa GR-ADN puede reprimir la expresión génica (Johnson et al. 2021; Vettorazzi et al. 2022). Como ejemplo, se ilustran la interacción de GR α y GR β , con dominio negativo de GR β en inhibición de la transcripción de genes dependientes de GR α (**Figura 1.14.d**); la competencia por superposición de sitios de unión con otros TF (**Figura 1.14.e**); unión a GREs negativos o nGREs, con un monómero de GR de cada lado de la hélice de ADN, y represión de la transcripción (**Figura 1.14.h**); e inhibición de la expresión génica por secuestro de TF (**Figura 1.14.g**) (Butz and Patócs 2022).

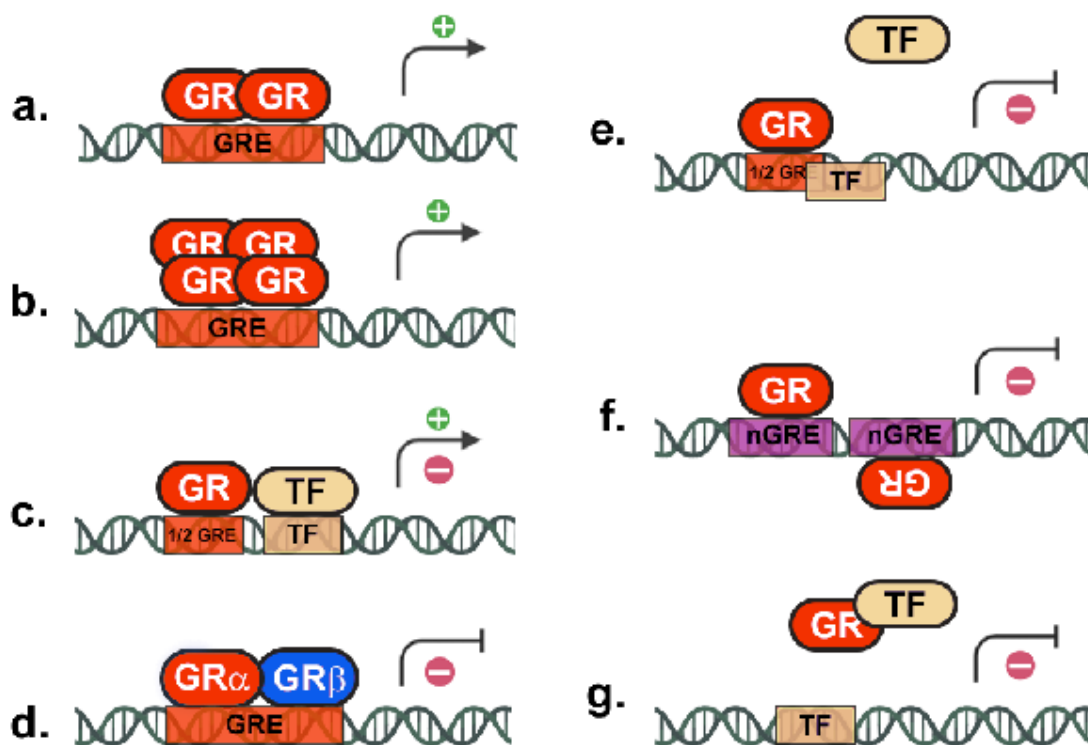


Figura 1.14. Interacción de GR con GREs en forma de dímeros (**a**) o tetrámeros (**b**), favoreciendo la expresión génica. **c.** Unión de GR a “sitios compuestos” e interacción con otro TF. **d.** Interacción de GR α y GR β . **e.** Competencia por superposición de sitios de unión con otros TF. **f.** Unión a GREs negativos o nGREs, con un monómero de GR de cada lado de la hélice de ADN, y represión de la transcripción. **g.** Inhibición de la expresión génica por secuestro de TF. Modificado de (Butz and Patócs 2022).

1.3.2 Interactores del GR

Ligandos: agonistas/antagonistas

Los NR son una familia privilegiada de blancos farmacológicos por dos características principales: por un lado, participan en numerosos procesos fisiológicos de interés clínico como el metabolismo, la inflamación y el control de procesos tumorales; por otro, su actividad es regulada por ligandos (moléculas pequeñas), a su vez plausibles de ser sintetizados y modificados para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Esta tarea, sin embargo, reviste diversos desafíos: por un lado, la multiplicidad de vías metabólicas en los que participa cada receptor plantea la necesidad de diseccionar las acciones deseadas y de las adversas y dilucidar los mecanismos subyacentes a cada una para su aprovechamiento farmacológico; por el otro, dada la similitud descrita entre los miembros de la familia de los NR en general y los SR en particular, existe una importante promiscuidad entre ligandos y SRs, generando interacciones cruzadas. Por último, la acción de los SR difiere según el tejido, pudiendo tener efectos antagónicos en un tipo celular respecto de otro (Bai Chang, Schmidt Azriel, Freedman Leonard P, 2003). El ejemplo farmacológico clásico de este último escenario es el uso del tamoxifeno: un ligando de ER con actividad antagonista en tejido mamario, con importantes aplicaciones terapéuticas en el cáncer de mama, y acción agonista en endometrio, hígado y hueso, lo que propició su uso en el tratamiento de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas, pero que luego demostró ser la causa del aumento en la incidencia de cáncer endometrial en pacientes oncológicas tratadas con esta droga (Jordan, Craig Jordan and O'Malley, 2007).

Actualmente, existe una gran diversidad de ligandos sintéticos del GR con diferentes propiedades funcionales. Describimos los utilizados en esta tesis: Dexametasona y Mifepristona (RU486).

Dexametasona

La dexametasona (Dex) es uno de los GC sintéticos más utilizados en la clínica (**Figura 1.15**). Se caracteriza por presentar potencia y eficacia elevadas, con alta afinidad y selectividad por el GR (Derendorf *et al.*, 1993). Su biodisponibilidad es también elevada y, junto con una lenta metabolización, determina una persistencia por más tiempo en plasma en comparación a los GC endógenos (Derendorf *et al.*, 1993) (Coutinho and Chapman, 2011). Dex es utilizado como un agonista completo del GR, capaz de promover todas las funciones del receptor, resultando en un fuerte inmunosupresor y antiinflamatorio, aunque con los efectos adversos característicos de los GC en tratamientos prolongados (Patrick, 2002). Además de su uso clínico, se utiliza ampliamente en ensayos *in vivo* e *in vitro* para estudiar el mecanismo de acción del GR y la respuesta biológica resultante (Coutinho and Chapman, 2011).

Mifepristona (RU486)

RU486 es un ligando sintético del GR desarrollado en 1980, que también tiene una alta afinidad por el PR (**Figura 1.15**). Con una afinidad aparente 3 veces mayor que Dex para GR, y 5 veces la de progesterona para PR, exhibe un efecto antagonista en ambos receptores (Spitz and Bardin, 1993; Weikum *et al.*, 2017). Inicialmente desarrollado en la búsqueda de un compuesto antiglucocorticoide, sus propiedades como antagonista competitivo de PR derivó en su uso clínico como abortivo.

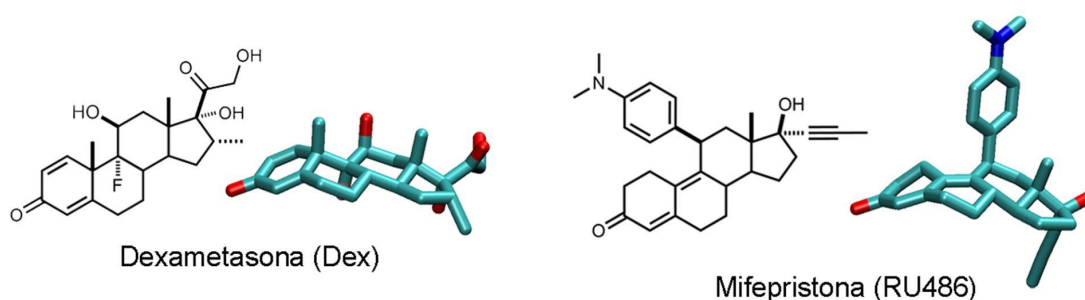


Figura 1.15. Ligandos sintéticos del GR. Se muestran las estructuras 2D y 3D de Dexametasona y Mifepristona (RU486).

Correguladores

Los correguladores son proteínas que reorganizan el entorno de la cromatina concomitantemente con el reclutamiento de TF (van der Laan and Meijer, 2008), mediando la señal entre el TF unido al ADN y la maquinaria transcripcional.

Clásicamente, los correguladores se han clasificado en coactivadores y correpresores según su influencia en la transcripción. Los coactivadores favorecen la transcripción génica mediante la apertura de la cromatina, facilitando el reclutamiento de factores adicionales y, finalmente, la activación de la maquinaria de transcripción basal (Stallcup and Poulard, 2020). Pueden funcionar como andamio estructural para la unión de otras proteínas reguladoras, o presentar actividades enzimáticas como histona acetiltransferasa (HAT), metiltransferasa (HMT) o de remodeladores de la cromatina dependiente de ATP, como el complejo SWI/SNF (Rowan and O'Malley, 2000; Lonard and O'Malley, 2005; Weikum *et al.*, 2017; Skowron *et al.*, 2019; Stallcup and Poulard, 2020). Los correpresores, por su parte, aumentan la condensación de la cromatina y presentan actividad histona desacetilasas (HDAC). Sin embargo, se ha demostrado que la acción activadora o represora no es una característica intrínseca de cada corregulador sino que es dependiente del tipo y contexto celular en el que se exprese (van der Laan and Meijer, 2008; Weikum *et al.*, 2017).

El control transcripcional por parte del GR requiere la interacción de proteínas correguladoras con los dominios de función de activación AF-1 y AF-2 del receptor. Por ejemplo, el AF-1 interactúa de manera independiente del ligando con la proteína remodeladora de cromatina ATPasa BRG1, y recluta HATs como p/CAF y CBP/p300 (Weikum *et al.*, 2017). En el LBD, el AF-2 actúa de manera dependiente del ligando y recluta coactivadores de la familia p160 o correpresores de las familias SMRT y NCoR. El análisis estructural de esta región del receptor ha proporcionado una visión profunda de la interacción del GR con los co-reguladores. Como mencionamos anteriormente, el AF-2 de los NR está formado por las hélices 3, 4 y 12, con las que interactúan los correguladores a través de motivos LxxLL (L: leucina, x: cualquier aminoácido) altamente conservados denominados *cajas de NR*, o motivos (L/I)XX(I/V)I o LXXX(I/L)XXX(I/L) (L: leucina, I: isoleucina, V: valina, X: cualquier aminoácido) denominados *cajas de correpresores de NR*

o CoRNR, respectivamente. La estructura detallada del AF-2 y su interacción específica con diversos péptidos correguladores serán analizadas en el capítulo 3 de esta tesis.

El receptor de progesterona (PR)

Desde el punto de vista funcional, mencionamos que los receptores de esteroides actúan como factores de transcripción activados por ligando y cumplen funciones biológicas esenciales en procesos como metabolismo, supervivencia y muerte celular. En particular, GR y PR son miembros altamente relacionados (Thornton, 2001) y comparten características estructurales y funcionales diversas que incluyen el reconocimiento de secuencias específicas de ADN en sus genes blanco por medio de su DBD (Lieberman *et al.*, 1993; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Evans, 2005); la unión a chaperonas en ausencia de hormonas, formando complejos muy similares (Pratt and Toft, 1997) y la interacción con una población común de cofactores en respuesta a la unión de ligandos al LBD (Westin, Rosenfeld and Glass, 1999). A pesar de estas semejanzas, las respuestas biológicas resultantes de su activación son llamativamente diferentes. Más aún, en aquellos tejidos en donde se expresan ambos receptores, estos ejercen respuestas diferentes y hasta opuestas: *i.e* en la glándula mamaria, contrario al efecto de progesterona, los glucocorticoides promueven la síntesis de proteínas de la leche durante la lactancia (Groner, Altiok and Meier, 1994). Además, existe evidencia que asocia la activación de PR con la incidencia y la progresión de tumores mamarios (Horwitz, 1992), mientras el GR es conocido como un supresor de la proliferación de células tumorales mamarias (Goya *et al.*, 1993).

Aun cuando GR y PR son dos de los NR más profundamente estudiados, poca atención ha sido puesta sobre su posible interacción directa y cómo su actividad combinada regula la expresión de genes. Teniendo en cuenta que estos receptores no sólo se coexpresan sino que se coactivan en muchos tipos celulares, su estudio pormenorizado requiere incluir los mecanismos de interacción cruzada o *crosstalk* entre ellos. Detalles de esta interacción funcional serán analizadas en el capítulo 4.

1.4. Objetivos

En esta tesis nos proponemos investigar las bases moleculares de la interacción del GR con diferentes moléculas que regulan su actividad, tanto estructural como funcionalmente, con el objetivo general de generar conocimiento que ayude al desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la acción terapéutica de los glucocorticoides. Para cada uno de los interactores seleccionados nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Identificar los determinantes moleculares del agonismo y antagonismo. Caracterizar los mecanismos alostéricos involucrados en la respuesta biológica de los glucocorticoides Dex y RU486 al unirse al GR LBD. Aportar información sobre cómo estos ligandos modulan la estructura y dinámica que permita contribuir a un diseño racional de nuevos ligandos con mejor actividad.
- 2) Evaluar la interacción entre el GR LBD y los correguladores de la transcripción en respuesta a diferentes ligandos. Estudiar los determinantes moleculares de esa interacción. Aportar información sobre la selectividad de cada complejo receptor/ligando por los correguladores con el fin de aumentar nuestro conocimiento respecto la acción tejido específica de los glucocorticoides, y en consecuencia contribuir a mejorar el uso terapéutico de estos compuestos.
- 3) Investigar la interacción funcional entre el GR y el PR. Analizar estructuralmente la posible formación de heterocomplejos GR DBD/PR DBD y estudiar su estabilidad. Aportar información sobre la interacción cruzada GR/PR con el fin de lograr una visión más integral respecto a la acción conjunta de ambos receptores en aquellos tejidos en los cuales se co-expresan.

CAPÍTULO 2.
INTERACCIÓN CON EL LIGANDO.
BASES MOLECULARES DEL AGONISMO/ANTAGONISMO

CAPÍTULO 2.

Bases Moleculares del Agonismo/Antagonismo

Antecedentes

Como se mencionó en el capítulo 1, el GR es un factor de transcripción (Weikum, Liu and Ortlund, 2018) caracterizado como una proteína modular con tres dominios destacados y conservados: un dominio de transactivación N-terminal, un dominio central de unión al ADN (DBD) y un dominio de unión a ligando C-terminal (LBD). El LBD consta de 11 hélices α (H1; H3-H12) y cuatro pequeñas hojas β ; se pliegan en una estructura globular que encierra un bolsillo hidrofóbico central de unión a ligando denominado bolsillo de unión al ligando o *ligand binding pocket* (LBP, **Figura 2.1.a**) (Veleiro *et al.*, 2010). Por otro lado, el LBD alberga una segunda interfaz de dimerización y el dominio para la función de activación transcripcional dependiente de ligando AF-2. En particular, el dominio AF-2 es un surco principalmente hidrofóbico formado por residuos de las hélices H3, H4 y H12, donde la posición de la H12 juega un papel fundamental en la conformación espacial de AF-2 y la función del GR (Veleiro *et al.*, 2010).

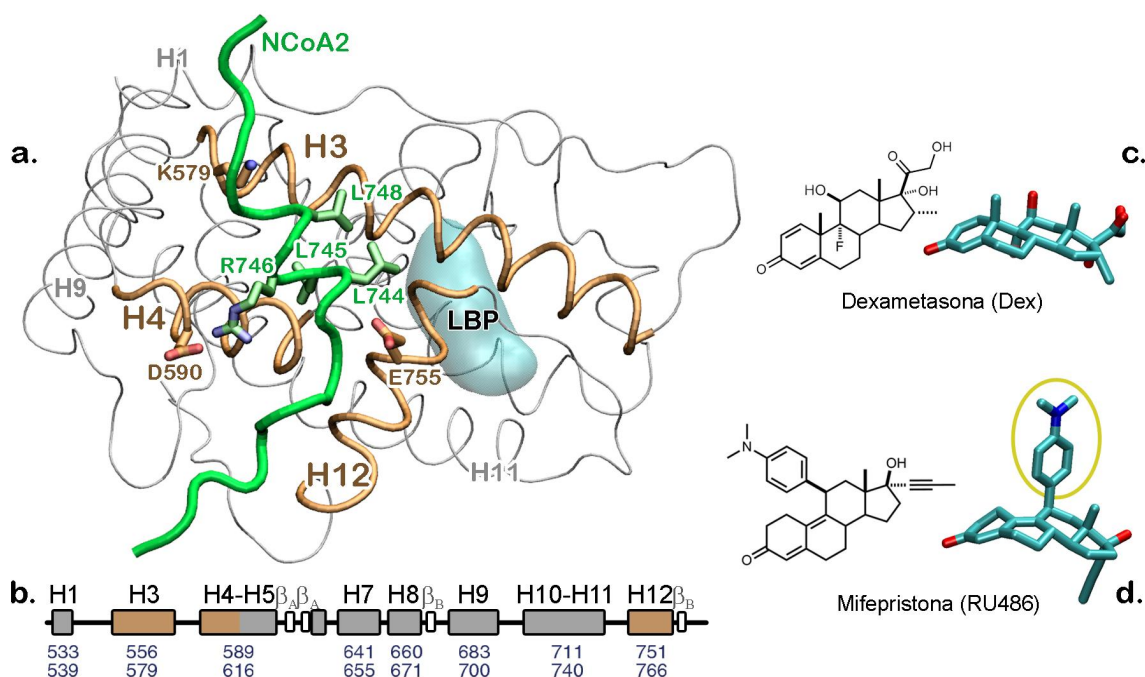


Figura 2.1. **a.** Estructura tridimensional del GR LBD (PDB ID:1m2z, cadena A) resaltando las hélices H3, H4 y H12 que forman el dominio AF-2, el cual interactúa con un péptido correspondiente al coactivador NCoA-2 (verde). La posición del LBP se indica como una superficie cian. **b.** Esquema de la estructura secundaria del GR LBD (los números indican el primer y último residuo de cada hélice). **c** y **d.** Estructuras 2D y 3D del glucocorticoide dexametasona (Dex) y el antiglucocorticoide mifepristona (RU486). Se destaca el sustituyente dimetilánilina de RU486.

2.1 Modelos del cambio inducido/selección conformacional

Un tema central dentro del estudio de los NRs es cómo los diferentes ligandos controlan la estructura y la dinámica de la H12 (Kojetin and Burris, 2013) (Rastinejad *et al.*, 2013). Inicialmente, el análisis de las primeras estructuras cristalográficas de LBD aislados condujo a proponer la denominada hipótesis del ajuste inducido (también conocida como mecanismo de “trampa de ratón”) para explicar las bases moleculares de acción. Esta hipótesis postula que, al unirse el agonista al estado inactivo del receptor se produce un cambio conformacional hacia un estado activo. La estructura de algunos NR LBD pudo ser resuelta en ausencia de ligando (estado apo), y si bien en algunos de ellos la H12 ha cristalizado alejada del cuerpo de la proteína (Gampe *et al.*, 2000), estudios posteriores revelaron que la H12 efectivamente interacciona con el resto

del receptor. Por lo tanto, se concluyó que esas posiciones alejadas observadas probablemente fueran consecuencia de un empaquetamiento artificial en los cristales (Batista and Martínez, 2013). En contraste con la hipótesis del ajuste inducido, el mecanismo de selección conformacional (Michel, 2016) propone que el estado apo del receptor comprende un conjunto de conformaciones en las que la H12 de los NRs fluctúa entre diferentes posiciones plegadas, y donde la unión del ligando impulsa la población relativa de cada subconjunto. En este sentido, utilizando resonancia magnética nuclear (RMN) de flúor-19 (^{19}F), Chrisman et al. (Chrisman et al., 2018) demostraron que la H12 del receptor nuclear *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPAR γ) consiste en un conjunto dinámico de conformaciones donde las poblaciones relativas se correlacionan con la actividad del receptor. En el receptor apo, el dominio AF-2, incluida la H12, explora relativamente rápido muchas conformaciones. A su vez, la unión de agonistas o de agonistas inversos consolida el conjunto del complejo en estados activos o inactivos, estructuralmente distintos, lo que favorece la unión de un coactivador o un correpresor, respectivamente.

2.2 Estructuras cristalográficas del GR

Para el GR LBD, se archivan más de 40 estructuras cristalográficas en el *Protein Data Bank* (PDB, www.rcsb.org), en su mayoría unidas a ligandos que estabilizan la H12 en una conformación agonista (Bledsoe et al., 2002). Para estados no agonistas, dos estructuras de complejos con RU486 fueron resueltas (**Figura 2.2**) (Kauppi et al., 2003; Schoch et al., 2010), aportando información sobre el modo de acción del antagonismo de este antiglucocorticoide. En PDB ID:1nhz, se observa que el grupo dimetilanilina de RU486 impide que la H12 adopte una conformación agonista. Sin embargo, esta estructura está incompleta y muestra una H12 completamente desplegada del resto del receptor (**Figura 2.2a**) y unida a otra subunidad GR LBD de la celda unidad adyacente. Como se describió anteriormente, esta conformación es atribuible a un artificio de técnica de cristalización. Por su parte, el caso de la estructura tetramérica PDB ID:3h52 es mucho más informativo: el receptor se observa con la H12 en diferentes posiciones

(todas consistentes con estados no agonistas; **Figura 2.2 c y d**) donde algunas permiten la unión de un péptido correspondiente a un motivo correpresor (**Figura 2.2.c**). Desafortunadamente, la falta de varios residuos en la región H11-H12 y un plegamiento incompleto de la H1 y del loop H1-H3 en los cuatro monómeros de PDB ID:3h52 impiden su uso directo para estudios de modelado molecular adicionales.

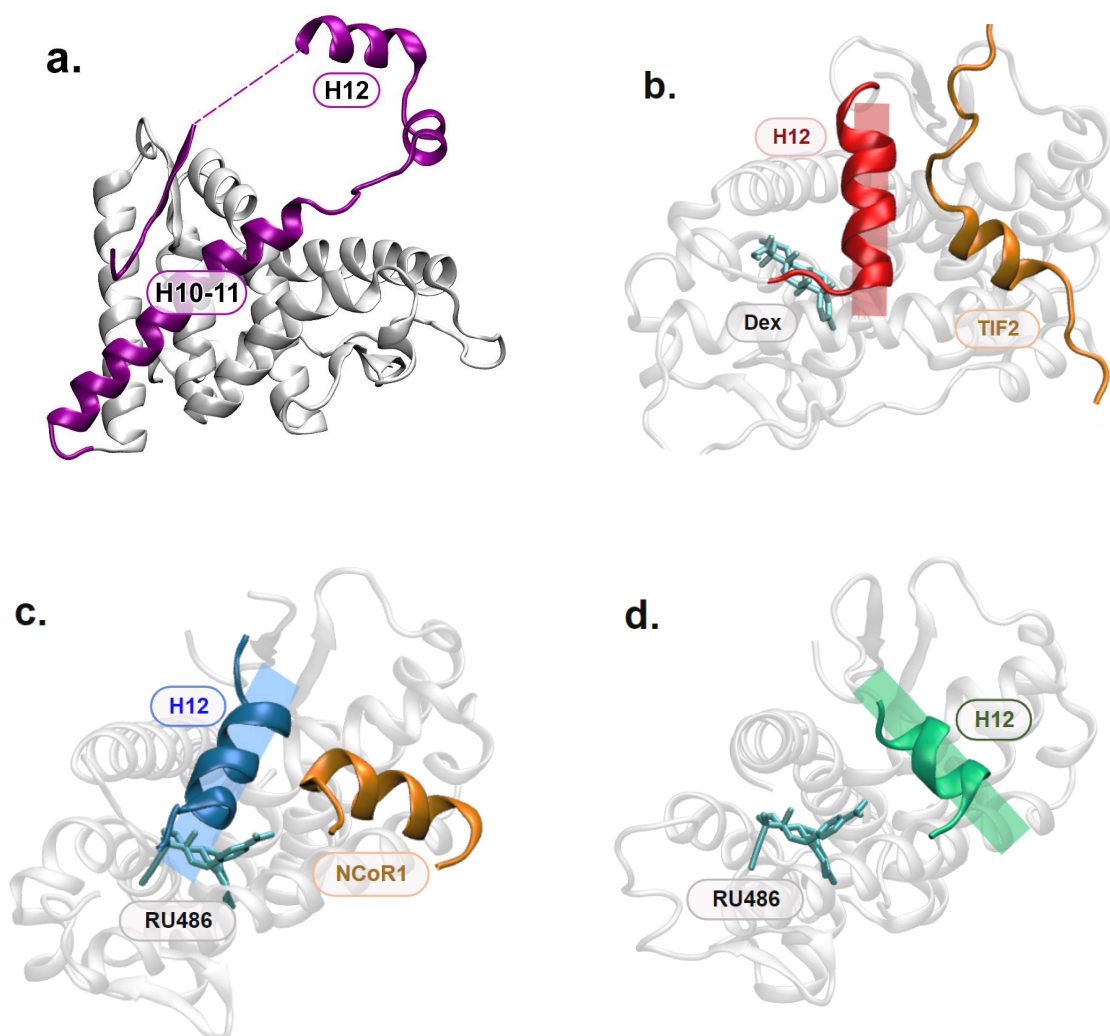


Figura 2.2. Comparación de diferentes posiciones de la GR LBD H12. **a.** Representación global de la estructura PDB ID:1nhz. En violeta se destacan H10-11, H12 y el *loop* H11-H12. Se observa la H12 desplegada y se indica con línea discontinua los residuos C-terminales a los que debería estar unida. **b.** Posición de la H12 en el complejo agonista GR LBD/Dex (PDB ID:1m2z). **c.** y **d.** Posiciones de la H12 en el complejo antagonista GR LBD/RU486 (PDB ID:3h52). En las figuras **b**, **c** y **d** el GR LBD está en la misma orientación para facilitar la comparación conformacional de la H12.

Durante las últimas décadas, las técnicas de modelado computacional han enriquecido el estudio de las estructuras y la dinámica de proteínas y constituyen una herramienta que complementa los datos experimentales (Maximova *et al.*, 2016; Hollingsworth and Dror, 2018). Un ejemplo destacado es el caso de la simulación por dinámica molecular (MD) que puede representar el comportamiento dinámico de moléculas en solución, permitiendo el análisis de la flexibilidad inherente de las proteínas y así la exploración del espacio conformacional. Sin embargo, su alcance se ve limitado cuando existen grandes barreras energéticas entre las distintas conformaciones. Para superar este obstáculo, se han desarrollado métodos de muestreo avanzados que amplían y mejoran la comprensión de la superficie de energía potencial de un sistema dado (Bernardi, Melo and Schulten, 2015). En el caso específico de los NRs, en el pasado la simulación por MD permitió obtener información valiosa sobre el modo de unión del ligando, las diferentes vías de unión y disociación, y las bases moleculares de acción de los receptores (Spyrakis*, Barril* and Javier Luque*, 2012). Además, recientemente se ha estudiado la relación entre el carácter agonista o antagonista de los ligandos y la posición de la H12 para otros receptores de esteroides: PR (Zheng, Lin and Mu, 2016), AR (Duan *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2019) y ER (Ng, 2016). Sin embargo, ningún estudio había sido dedicado a analizar en profundidad los equilibrios conformacionales de la H12 en el GR LBD.

Resultados

En este contexto, nuestra motivación consistió en explorar a través de diferentes métodos de simulación por MD, la correlación entre la función del ligando y el comportamiento de la H12 del GR LBD. Con este propósito, construimos y estudiamos diferentes sistemas del GR LBD a partir de las estructuras cristalinas PDB ID 1m2z y 3h52. La ausencia o la presencia de un ligando agonista (Dex) o un ligando antagonista (RU486) se combinó con el GR LBD en el estado agonista y en dos estados no agonista. Proponemos que las diferentes conformaciones iniciales para el análisis por MD clásica (cMD) podrían ofrecer un panorama más amplio sobre la dinámica de la H12. Además, incluir una combinación de MD dirigido (*Steered Molecular Dynamics*; SMD) y de *Umbrella Sampling* (US) podría proporcionar información adicional sobre los determinantes moleculares involucrados en la transición entre esos estados.

2.3 Preparación de los sistemas

El primer objetivo se centró en la construcción *in silico* de GR LBDs en estados no agonistas, con el fin de obtener estructuras viables para llevar a cabo simulaciones por MD. Como se mencionó anteriormente, los monómeros de PDB ID:3h52 presentan diferentes conformaciones de H12, pero los extremos N-terminal del GR LBD (H1 y *loop* H1-H3) están desplegados del cuerpo del LBD, y se empaquetan en otros monómeros de la misma celda unidad (**Tabla 2.1** y **Figura 2.3**), descrito en los detalles del archivo PDB como un proceso de intercambio de dominio o *domain swapping*. Aunque inicialmente este fenómeno se asoció a un artificio de cristalización, un estudio reciente de Suren *et al.* (Suren *et al.*, 2018) utilizando espectroscopía de fuerza atómica de una sola molécula mostró que el plegamiento de H1, de hecho, comprende el último paso en el proceso de plegamiento general del GR y ocurre solamente tras la unión del ligando en el bolsillo. Así, los monómeros de estructura PDB ID:3h52 podrían corresponder presumiblemente al estado abierto descrito por estos autores, constituyendo un estado intermedio receptivo a la unión del ligando. Sobre esta base,

consideramos factible obtener estados completamente plegados de sistemas no agonistas a partir de las estructuras de PDB ID:3h52.

PDB ID/ cadena	H1; <i>loop</i> H1-H3	Residuos faltantes	Péptido corregulador	Estado receptor
1m2z/A	plegados		NCoA-2	GR LBD ^{Ag}
3h52/A	desplegados	762-767 (<i>loop</i> C-terminal de H12)	NCoR-1	GR LBD ^{Ant1}
3h52/B	desplegados		NCoR-1	GR LBD ^{Ant2}
3h52/C	desplegados	738-754 (parte de H11; <i>loop</i> H11-H12; parte de H12)		GR LBD ^{Ant3}
3h52/D	desplegados	742-750 (<i>loop</i> H11-H12) y 762-765 (H12)		GR LBD ^{Ant1}

Tabla 2.1. Estructuras iniciales del GR LBD usadas para la cMD.

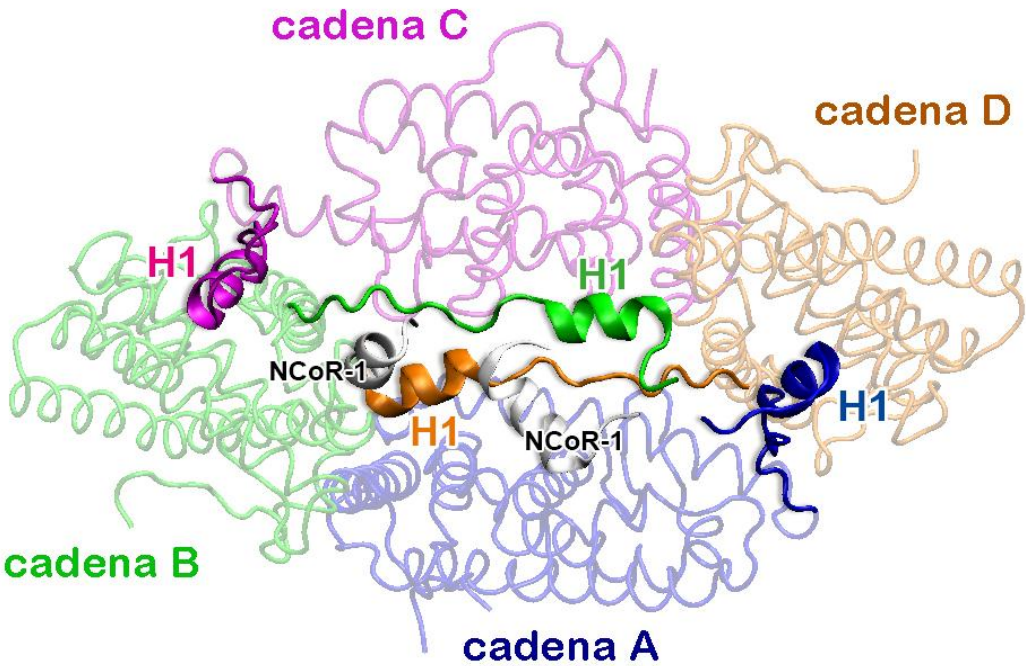


Figura 2.3. Vista general del tetramero GR LBD/RU486 (PDB ID:3h52): cadena A en azul, B en verde, C en magenta y D en naranja. Se destacan las hélices H1 y *loop* H1-H3 de cada monómero, donde se evidencia el fenómeno de *domain-swapping* entre las cadenas A y D por un lado, y B y C por el otro. Los péptidos NCoR-1 se muestran en blanco.

La alineación estructural entre los PDB ID 1m2z y 3h52 revela una gran congruencia entre la mayoría de las hélices del GR LBD (**Figura 2.4.a**). De hecho, su conformación concuerda desde el residuo 555 (H3) en adelante, excepto para la región H11-H12 donde las hélices exhiben posiciones ligeramente diferentes (ver más abajo). Después de comparar los ángulos diedros Phi y Psi de la H1 y el *loop* H1-H3 entre las estructuras completamente plegadas y parcialmente desplegadas, se observó que solo tres ángulos al final del *loop* H1-H3 (PhiAsp554, PsiSer555 y PhiSer555) divergen (**Figura 2.4.b**). Aparte de estas diferencias puntuales, no se encontraron cambios relevantes a lo largo del resto del *loop* o hélices H1 y H3. Así, después de haber establecido la similitud estructural entre ambos complejos, obtuvimos sistemas de estados no agonistas completamente plegados reemplazando las coordenadas de los residuos 528 a 554 en las cadenas PDB ID:3h52 con las de los correspondientes residuos de la cadena A en el PDB ID:1m2z.

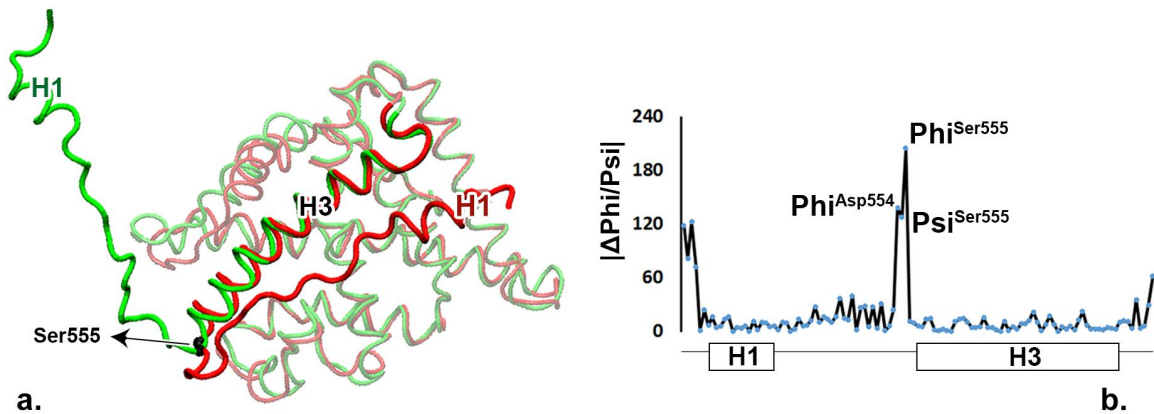


Figura 2.4. a. Superposición de cadena A de PDB ID:1m2z (rojo) y cadena B de PDB ID:3h52 (verde). **b.** Valor absoluto de la diferencia entre los ángulos Phi y Psi del segmento de la H1 y el *loop* H1–H3 en PDB ID:1m2z, cadena A y PDB ID:3h52, cadena B.

A continuación, se analizó por separado cada monómero de PDB ID:3h52. En la cadena A (denominada GR LBD^{Ant1}), faltan 6 residuos después del *loop* C-terminal de la H12 (**Tabla 2.1**), que en nuestro sistema fue agregado usando el software Modeller (Webb and Sali, 2016). En la cadena B (denominada GR LBD^{Ant2}), el GR LBD se resolvió

por completo. La alineación estructural entre los dos estados GR LBD no agonistas construidos aquí (GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2}) y el sistema agonista (GR LBD^{Ag}) muestra las diferencias en la posición de la H12 (**Figura 2.5.a**). Por otro lado, la cadena C (denominada GR LBD^{Ant3}) reveló una posición H12 desplazada hacia el lado opuesto del sustituyente en 11 β de RU486, en comparación con GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2}, ocupando parcialmente el surco AF-2 (**Figura 2.5.b**). Desafortunadamente, esta hélice está mal resuelta, con 17 residuos faltantes a lo largo del extremo C-terminal de H11, el *loop* H11-H12 y parte de H12. Intentamos infructuosamente modelar esta gran parte del receptor con Modeller, pero no se lograron estructuras convincentes. Por último, la cadena D, con 13 residuos no resueltos a lo largo del *loop* H11-H12 y la hélice H12, posee una configuración H12 equivalente a la observada en la cadena A (GR LBD^{Ant1}). Las simulaciones MD preliminares de estos dos últimos modelos mostraron una alta inestabilidad estructural, por lo cual, en vista de lo anterior, ni la cadena C ni la D fueron consideradas en nuestro estudio de simulación MD.

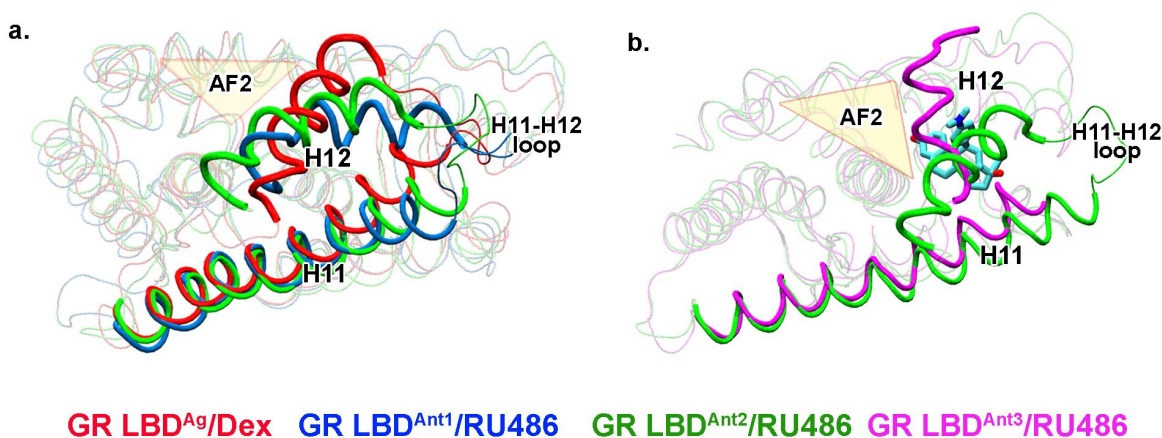
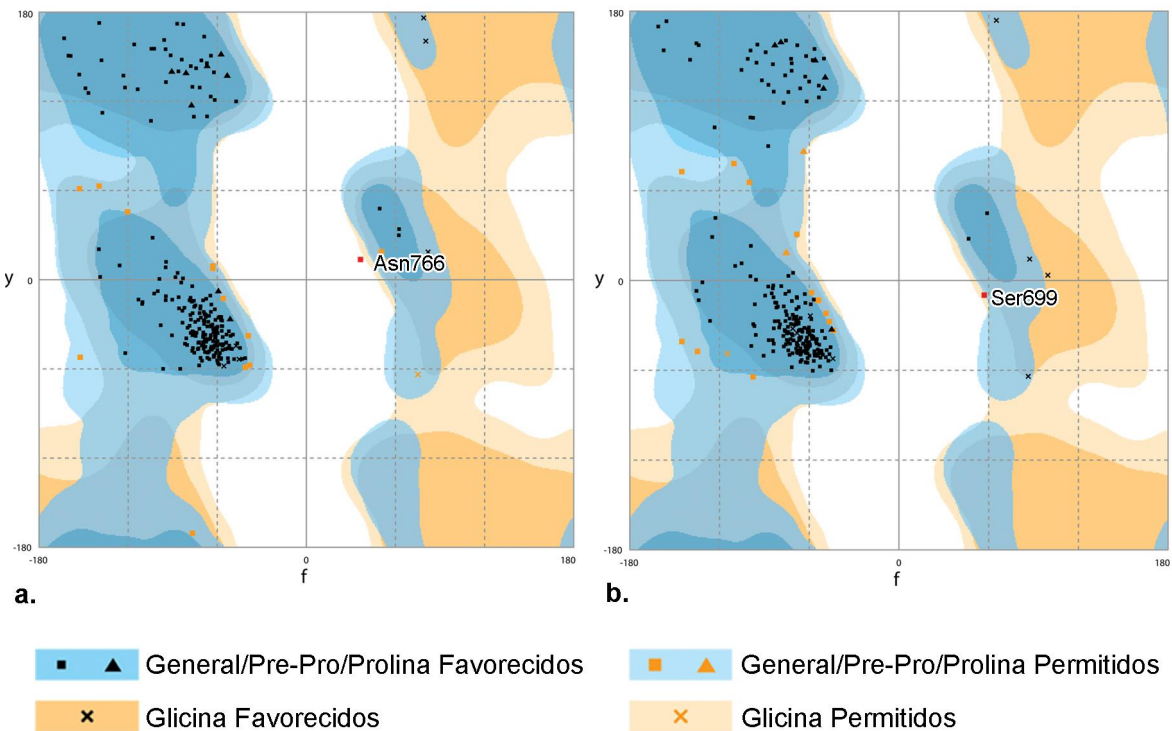


Figura 2.5. a. Superposición de las estructuras iniciales de GR LBD^{Ag}, GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2} evidenciando las diferentes posiciones de la H12. **b.** Superposición de cadena B (GR LBD^{Ant2}) y cadena C (GR LBD^{Ant3}) de PDB ID:3h52. RU486 está coloreado en cian. En ambas figuras, la H11, la H12, y el *loop* H11–H12 están resaltados, y la posición del AF-2 se indica con un triángulo amarillo.

2.4 Simulación por MD clásica del GR LBD

2.4.1. Evaluación inicial de GR LBD no agonistas

Los complejos GR LBD^{Ant1}/RU486 y GR LBD^{Ant2}/RU486 se minimizaron y equilibraron mediante simulaciones MD clásicas. Los gráficos de Ramachandran de las estructuras resultantes muestran que casi todos los residuos están presentes en las regiones favorecidas, pocos en las permitidas y solo uno en una región prohibida (**Figura 2.6**).



	a	b
Número de residuos en regiones favorables (previsto 98%):	232 (93.9%)	230 (93.1%)
Número de residuos en regiones permitidas (previsto 2%):	14 (5.7%)	16 (6.5%)
Número de residuos en regiones prohibidas:	1 (0.4%)	1 (0.4%)

Figura 2.6. Gráficos de Ramachandran de los complejos equilibrados de GR LBD^{Ant1}/RU486 (**a**) y GR LBD^{Ant2}/RU486 (**b**).

La estructura secundaria de la sección modificada permaneció comparable a la de GR LBD^{Ag}: la H1 se estabilizó notablemente en la posición adquirida y el *loop* H1-H3 no sufrió deformaciones estructurales sustanciales. Además, el análisis de los contactos entre el extremo N-terminal y el resto del receptor reveló una gran similitud entre el GR LBD^{Ag} original y los sistemas GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2} construidos (**Figura 2.7 a y b**).

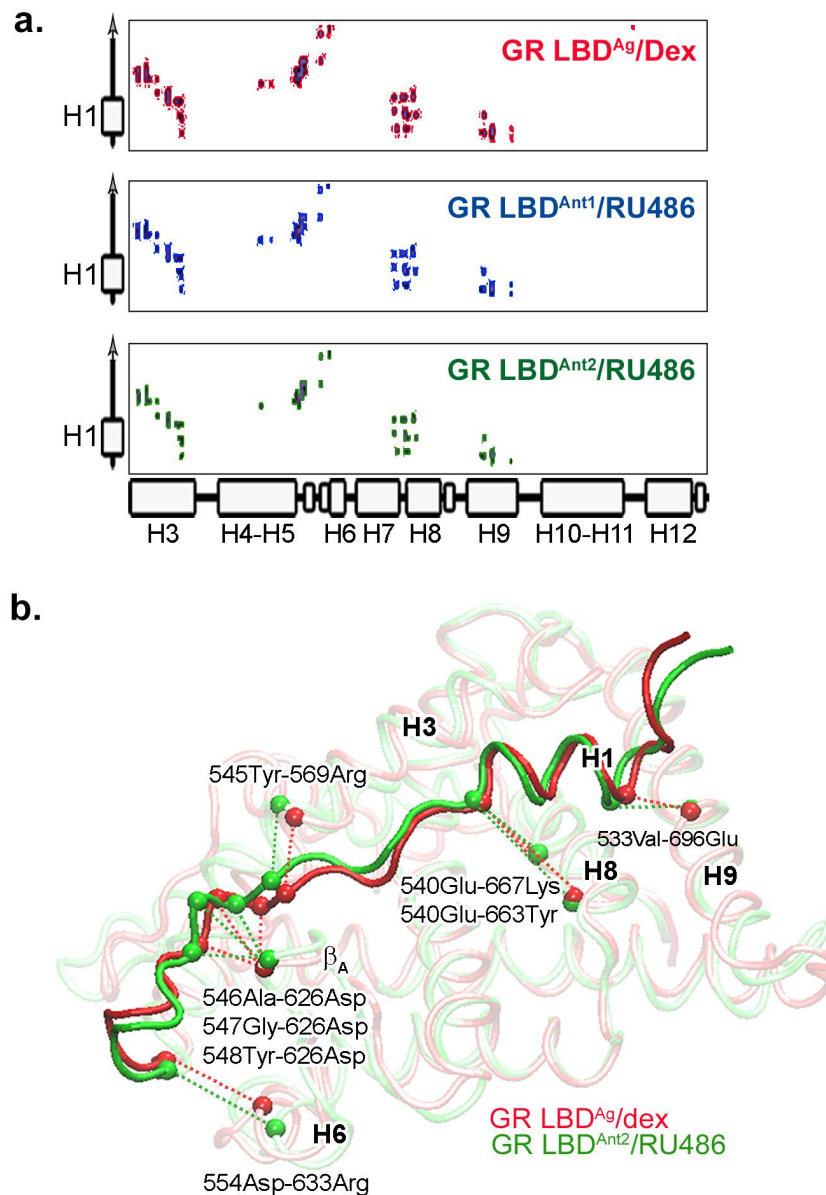


Figura 2.7. a. Mapa de contacto entre los residuos de la H1 y el *loop* H1-H3 y los restantes residuos del receptor para los complejos equilibrados. **b.** Principales contactos entre la H1 y el *loop* H1-H3 y el resto del receptor. Los Ca de los residuos involucrados son mostrados como esferas.

2.4.2. Simulación de dinámica molecular clásica de sistemas GR LBD

Una vez evaluada la calidad de los modelos GR LBD iniciales, simulamos los sistemas GR LBD^{Ag}, GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2} a través de cMD de 500 ns para estudiar el comportamiento dinámico en diferentes condiciones (**Tabla 2.2**), es decir, en presencia del ligando correspondiente (Dex para GR LBD^{Ag}; RU486 para GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2}), en ausencia de ligando (sistemas apo) y en presencia del otro ligando (RU486 para GR LBD^{Ag}; Dex para GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2}).

Sistema	Receptor	Ligando
1	GR LBD ^{Ag}	Dex
2	GR LBD ^{Ag}	-
3	GR LBD ^{Ag}	RU486
4	GR LBD ^{Ant1}	RU486
5	GR LBD ^{Ant1}	-
6	GR LBD ^{Ant1}	Dex
7	GR LBD ^{Ant2}	RU486
8	GR LBD ^{Ant2}	-
9	GR LBD ^{Ant2}	Dex

Tabla 2.2. Sistemas simulados

2.4.3. Estabilidad y patrón de fluctuación de las trayectorias de cMD

Inicialmente, se evaluó la estabilidad de las trayectorias de cMD mediante el monitoreo del RMSD de los átomos del esqueleto proteico, en relación a la estructura inicial correspondiente. Se observó que si bien durante los primeros 200 ns la estructura de la proteína presentó fluctuaciones, todos los sistemas GR LBD^{Ag} y GR LBD^{Ant2} se estabilizaron a partir de entonces en valores constantes, inferiores a 2,2 Å (**Figura 2.8.a**). Los sistemas GR LBD^{Ant1} sufrieron desviaciones significativas a lo largo de la simulación, y solo para el GR LBD^{Ant1}/RU486 la trayectoria tiende a converger. Por otro lado, el RMSD de los átomos Cα de H12 (**Figura 2.8.b**) mostró que a partir de los 200 ns, la posición del

H12 se estabilizó en todos los sistemas menos en el sistema GR LBD^{Ant1}/apo. Específicamente, en los sistemas GR LBD^{Ag} y GR LBD^{Ant1}, la H12 se estabilizó cerca de la posición de partida con sus ligandos originales (Dex y RU486, respectivamente)(**Figura 2.8.b**). Para GR LBD^{Ag}, la introducción de RU486 desvió ligeramente la H12, mientras que la eliminación del ligando lo desvió aún más considerablemente. Asimismo, en GR LBD^{Ant1}, la ausencia de ligando provocó una notable distorsión de la posición de la H12.

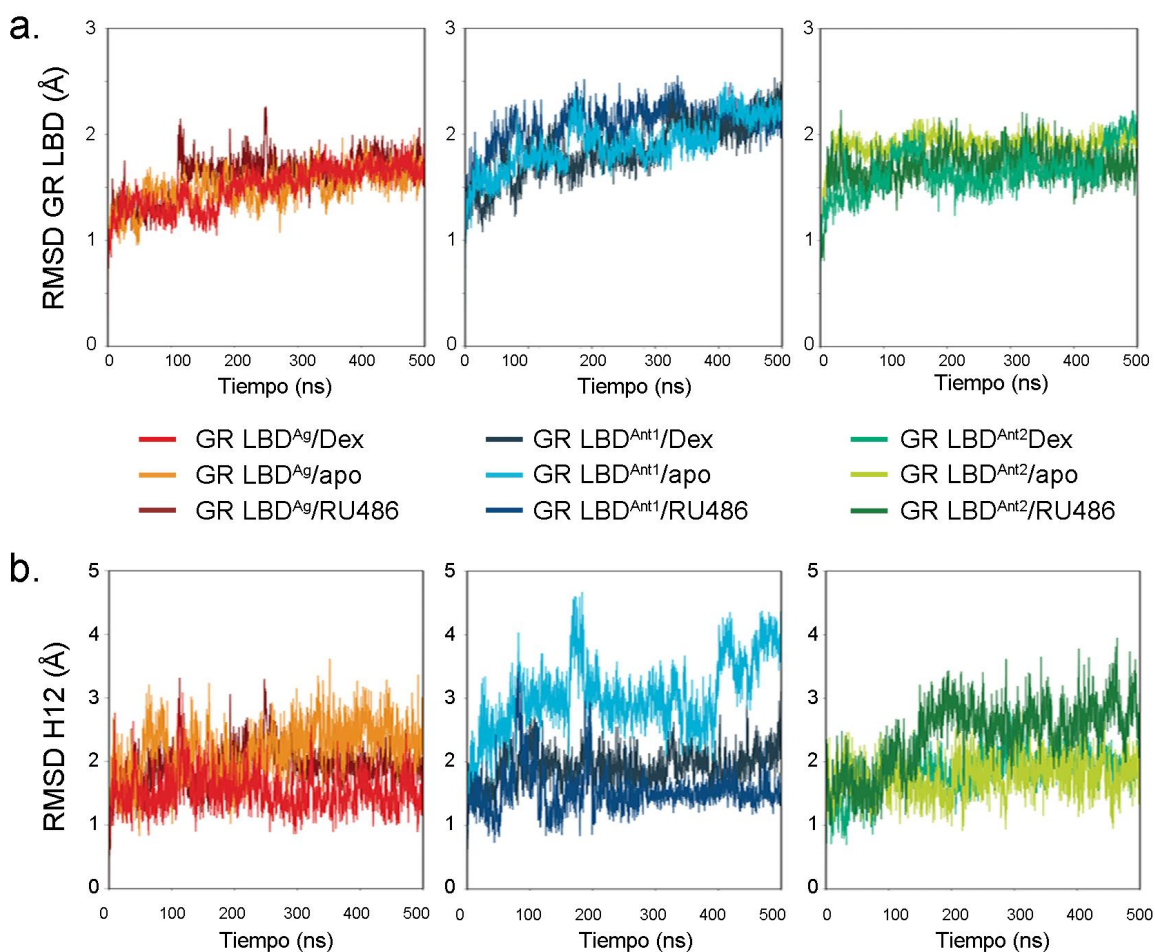


Figura 2.8. Desviación cuadrática media (RMSD) de los 9 sistemas simulados, medidos sobre todos los átomos del esqueleto del receptor (**a**) o sólo sobre los átomos del esqueleto de la H12 (**b**).

El RMSF calculado durante los últimos 300 ns de la simulación (**Figura 2.9**) reveló, además de la movilidad inherente de los *loops*, que algunas regiones de estructura secundaria poseen diferencias significativas entre sistemas. En cuanto al extremo

C-terminal, el complejo GR LBD^{Ag}/Dex mostró la menor movilidad, y la sustitución del ligando por RU486 incrementó claramente la fluctuación del *loop* H11-H12 y de los primeros residuos de la H12. Se observó un perfil de RMSF diferente para los sistemas GR LBD^{Ant1}, con una gran movilidad en el extremo C-terminal de la H12. Entre ellos, el GR LBD^{Ant1}/RU486 apareció como el más rígido; GR LBD^{Ant1}/apo presentó un incremento en la movilidad H12, y GR LBD^{Ant1}/Dex aumentó la fluctuación del *loop* H11-H12. A su vez, el patrón RMSF de los complejos GR LBD^{Ant2} se asemeja a los de los sistemas GR LBD^{Ag}, con cierta fluctuación aumentada para los residuos de la H12 de GR LBD^{Ant2}/dex.

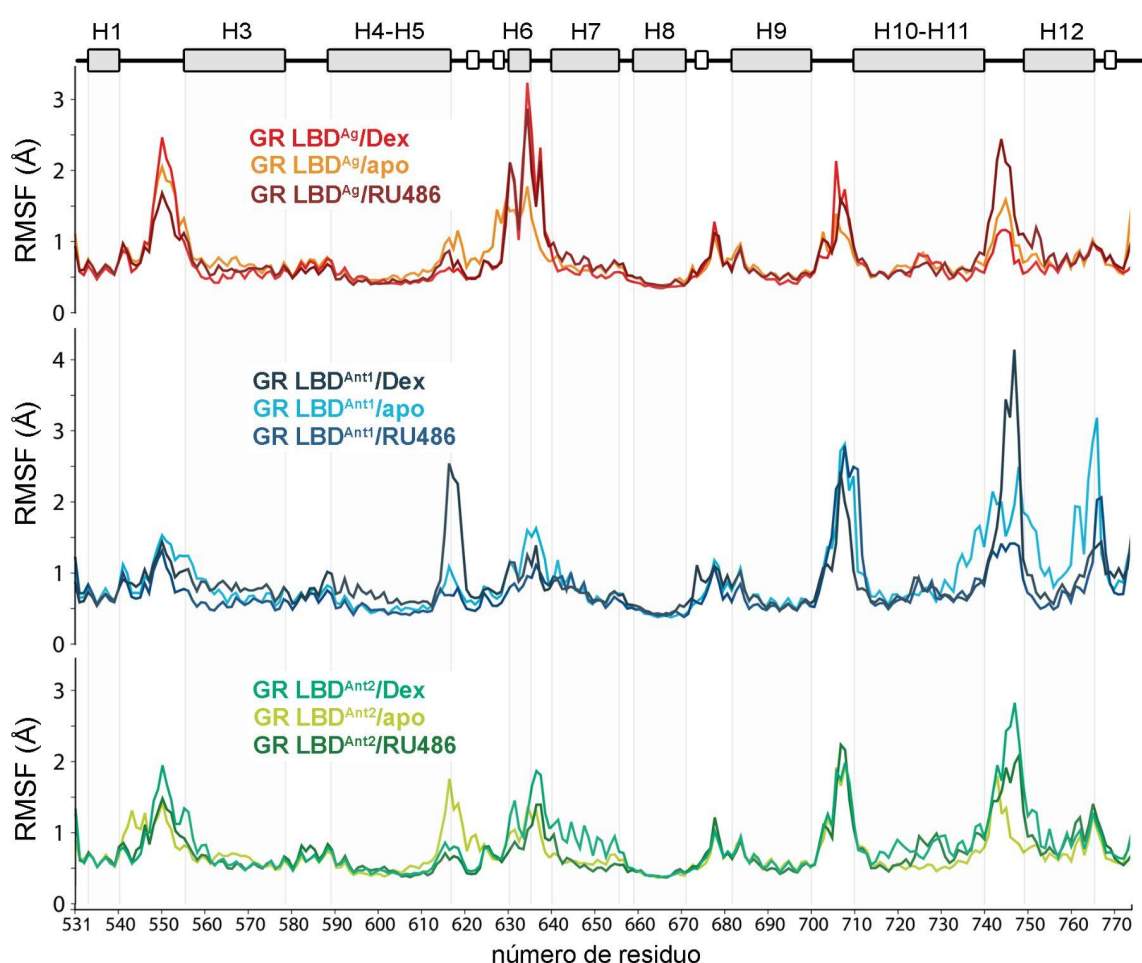


Figura 2.9. Fluctuación cuadrática media (RMSF) medida sobre el esqueleto de la proteína durante los últimos 300 ns de las simulaciones cMD.

2.4.4. Evolución de la conformación de la H12 en las trayectorias cMD

El análisis detallado del RMSF destacó la gran estabilidad de las hélices H3 y H10-H11 a lo largo de la cMD, particularmente del extremo C-terminal de H3 (residuos 568 a 579; en adelante, porción "B" o H3B) y los residuos N-terminales 711 a 721 del H10-H11 (en adelante, H10) (**Figura 2.9**). Esta característica nos permitió seleccionar estos segmentos prácticamente invariantes como referencia espacial para analizar la movilidad de la H12 a lo largo del tiempo. Se definieron tres vectores de igual dirección que los segmentos H3B, H10 y la hélice H12 y se calcularon los ángulos resultantes a lo largo de la cMD completa. De acuerdo con el análisis anterior del RMSD, la evolución temporal de estos ángulos confirmó que todos los sistemas convergieron después de los 200 ns (**Figura 2.10**) con excepción de GR LBD^{Ant1}/apo que presenta gran inestabilidad en el ángulo H3B-H12.

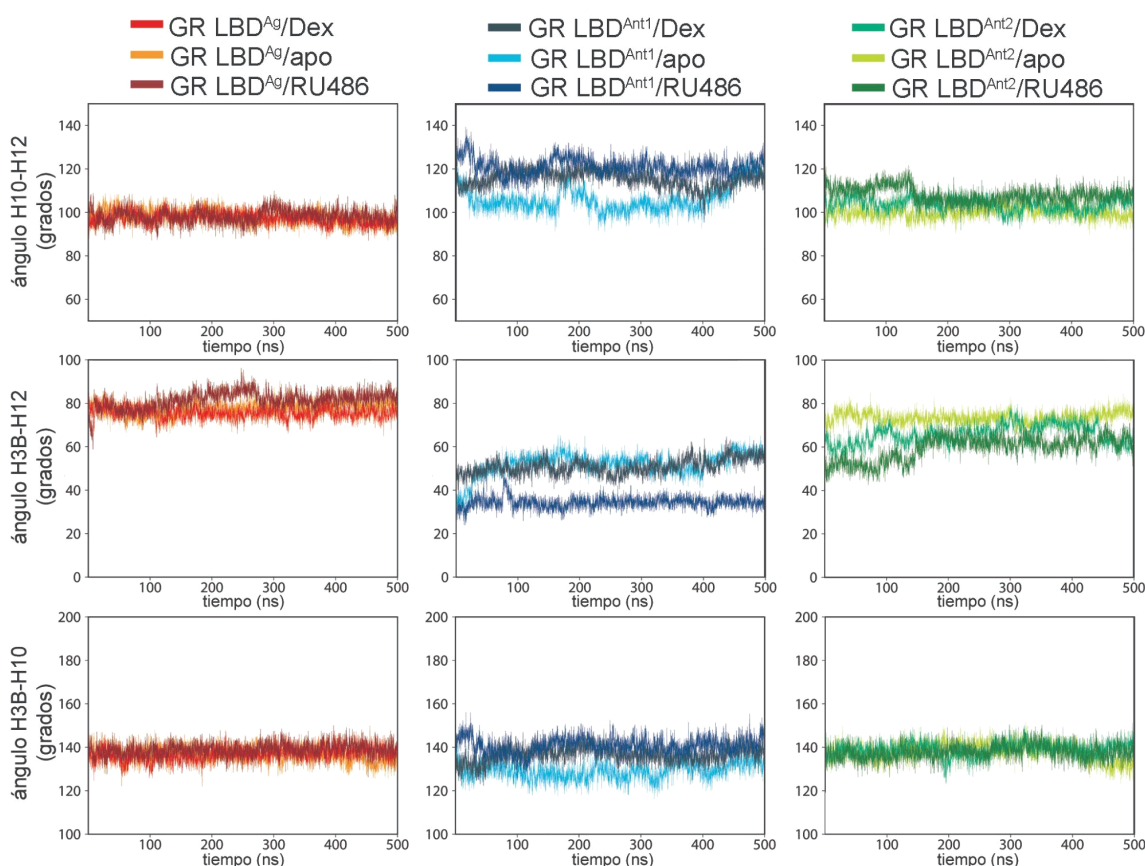


Figura 2.10. Evolución temporal del ángulo entre las hélices H3B y H12, H10 y H12, H3B y H10 para cada uno de los sistemas indicados.

Para facilitar la visualización, se usaron diagramas de caja que permiten comparar los valores de los ángulos H3B-H12, H3B-10 y H10-H12 durante los últimos 300 ns de cada trayectoria de cMD (**Figura 2.11**). Como era de esperar, el ángulo H3B-H10 se conservó entre los 9 sistemas, particularmente dentro de los complejos GR LBD^{Ag} y GR LBD^{Ant2} (**2.11.d**). Por el contrario, los ángulos H10-H12 (**2.11.b**) y H3B-H12 (**2.11.c**) mostraron un comportamiento más dependiente de la condición del LBP. Esto fue particularmente evidente para los sistemas GR LBD^{Ant1}, donde se observaron grandes cambios en ambos ángulos cuando se eliminó RU486 del LBP o se lo reemplazó por Dex. Aunque menos pronunciados, los sistemas GR LBD^{Ant2} también mostraron ciertas diferencias en la evolución de dichos ángulos. Por último, para los sistemas GR LBD^{Ag}, ambos ángulos sufren sólo pequeñas desviaciones y únicamente la presencia de RU486 perturba marcadamente el ángulo H3B-H12.

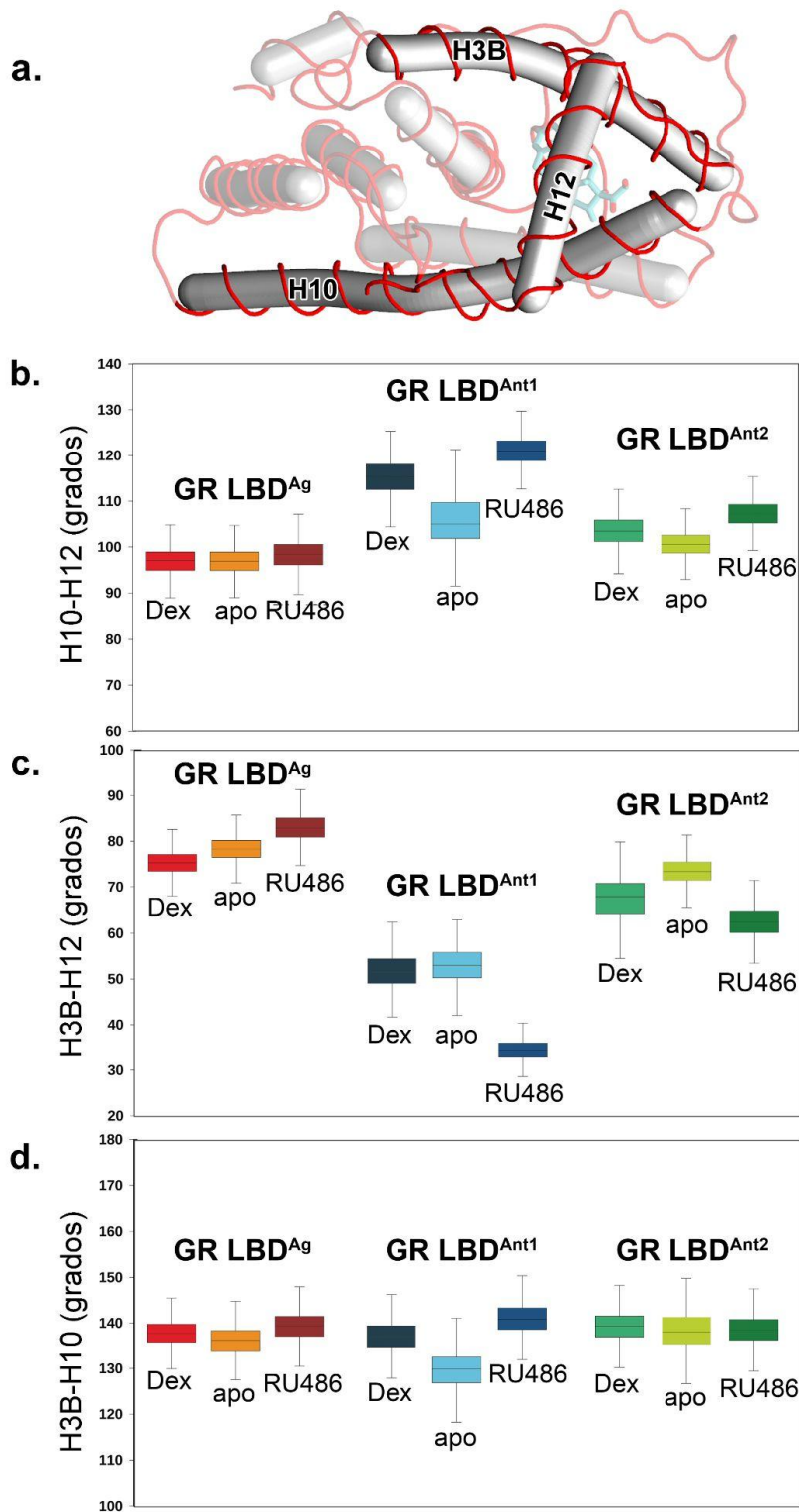


Figura 2.11.a. Estructura general del complejo GR LBD^{Ag}/dex. Los tubos grises muestran las formas de las hélices modeladas por Bendix (Dahl, Chavent and Sansom, 2012). Los segmentos H3B y H10 y la hélice H12 están identificados con letras negras. El ligando aparece en cian. **(b-d)** Box plots de los ángulos formados entre H10-H12 **(b)**, H3B-H12 **(c)** y H3B-H10 **(d)**.

Para una mayor caracterización de la conformación H12 estabilizada, calculamos la distribución espacial de los ángulos H3B-H12 y H10-H12 durante los últimos 300 ns de la simulación y los representamos como histogramas 2D (**Figura 2.12**). Allí, se muestran claramente los diferentes estados de la H12 alcanzados por cada sistema. En el caso del GR LBD^{Ag}, hubo una distribución estrecha de los ángulos H3B-H12 y H10-H12, alrededor de 75° y 98° respectivamente, correspondientes al estado GR LBD^{Ag}/Dex. La disposición de H12 no se alteró perceptiblemente después de la eliminación de Dex, pero su sustitución por RU486 alejó ligeramente al receptor del estado agonista. Sin embargo, la H12 no giró hacia ninguna de las posiciones observadas para los complejos GR LBD^{Ant1} o GR LBD^{Ant2}, sino en la dirección opuesta, pareciéndose llamativamente al estado GR LBD^{Ant3} (cf. **Figura 2.5.b**).

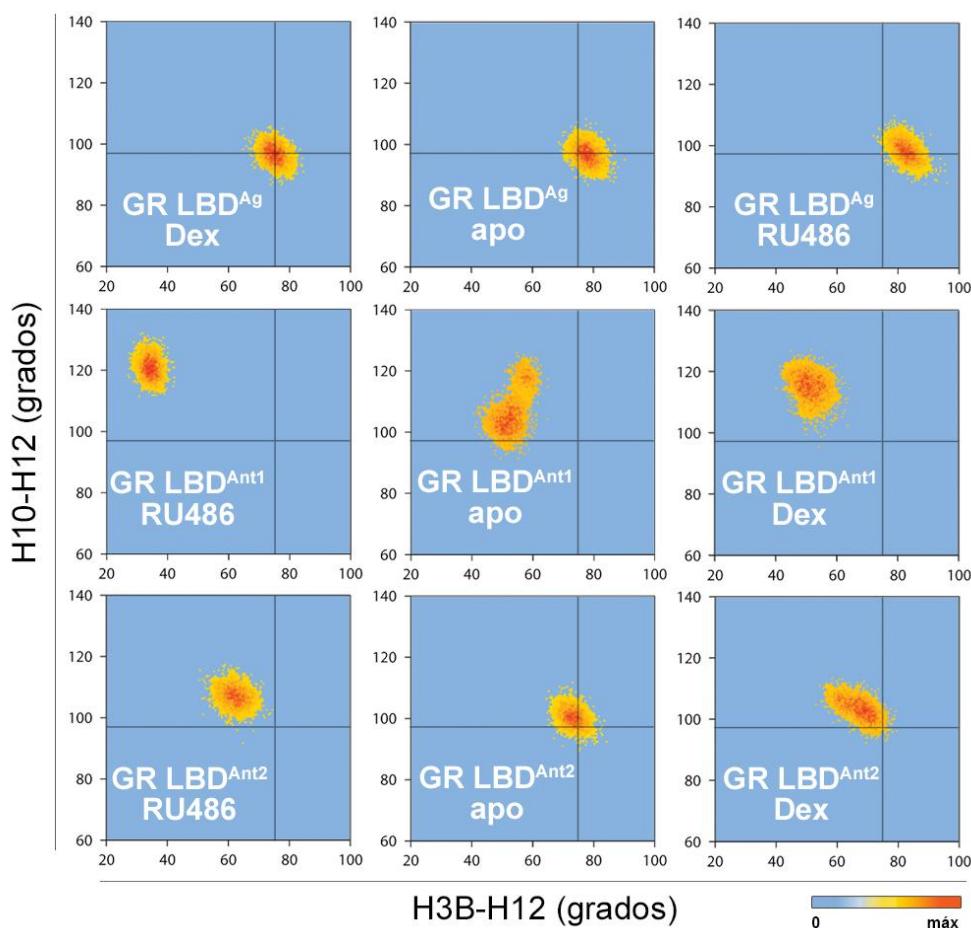


Figura 2.12. Distribución de los ángulos H3B-H12 y H10-H12 para los sistemas simulados. Los colores indican el número relativo: mayor prevalencia en rojo, menor prevalencia en amarillo. Se indican las coordenadas de la posición del complejo GR LBD^{Ag}/dex.

Para evaluar posibles cambios conformacionales adicionales en el GR LBD^{Ag}/RU486, extendimos la trayectoria hasta 1000 ns y comparamos la distribución del ángulo resultante con GR LBD^{Ag}/dex y LBD^{Ag}/RU486 300-500 ns (**Figura 2.13**). Comprobamos que la H12 mantuvo su deriva en la dirección mencionada, ocupando parcialmente el surco AF-2. Este estado emergente se denominó pseudo-GR LBD^{Ant3} y se incorporó a nuestro grupo de sistemas.

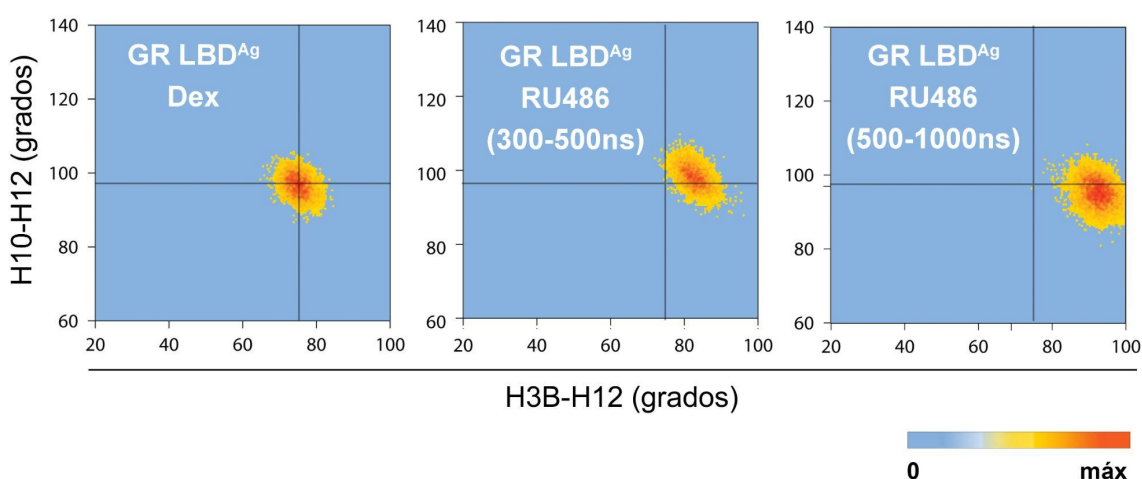


Figura 2.13. Distribución de los ángulos H3B-H12 vs H10-H12 para los sistemas indicados. Los colores indican el número relativo: mayor prevalencia en rojo, menor prevalencia en amarillo. Las cruces negras hacen referencia a la posición del complejo GR LBD^{Ag}/dex.

Para el complejo GR LBD^{Ant1}/RU486, los histogramas mostraron una distribución de ángulo estrecho a 30° para H3B-H12 y 122° para ángulos H10-H12 (**Figura 2.12**). Por el contrario, para los sistemas apo y Dex, la distribución de ángulos se aproxima a la de GR LBD^{Ant2}/RU486. Por lo tanto, esta conformación H12 presumiblemente describe un estado intermedio entre el estado antagonista GR LBD^{Ant1}/RU486 y el estado agonista GR LBD^{Ag}/Dex. En este sentido, los histogramas GR LBD^{Ant2}/apo y GR LBD^{Ant2}/Dex fueron notablemente similares a los de GR LBD^{Ag}/Dex y manifestaron cómo el estado intermedio evoluciona hacia el estado agonista cuando se elimina RU486 o se reemplaza por Dex.

En la **Figura. 2.14**, el diagrama esquematiza la evolución de cada sistema simulado. Los complejos derivados directamente de las estructuras cristalizadas conservan la H12 en una posición similar a la original, mientras que al variar la condición de LBP se modifica el destino de la H12 durante las MD.

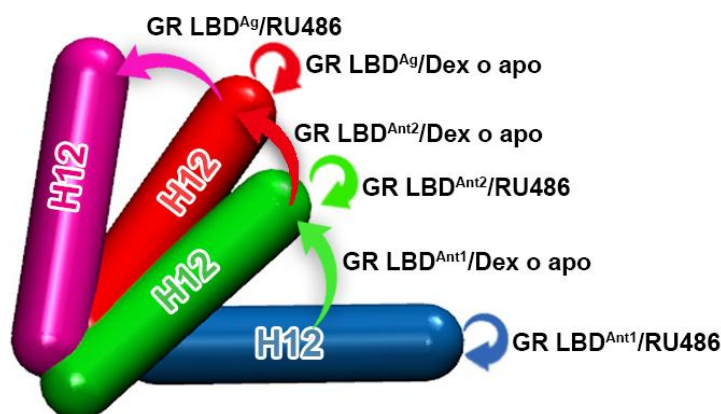


Figura 2.14. Representación esquemática de la evolución de la H12 a lo largo de las trayectorias MD. Las flechas circulares indican el mantenimiento de la posición de H12 para el sistema indicado, mientras que las flechas curvas muestran el desplazamiento de la H12 observado en las MD, donde el color representa la posición final en la trayectoria.

La **Figura 2.15** muestra imágenes representativas de las principales configuraciones observadas en el espacio configuracional de los ángulos H10-H12 y H3B-H12. Se puede observar que mientras la mitad C-terminal de la H12 ocupa una posición similar en todos los sistemas, su mitad N-terminal explora diferentes estados, que van desde bloquear virtualmente el dominio AF-2 hasta agrandarlo.

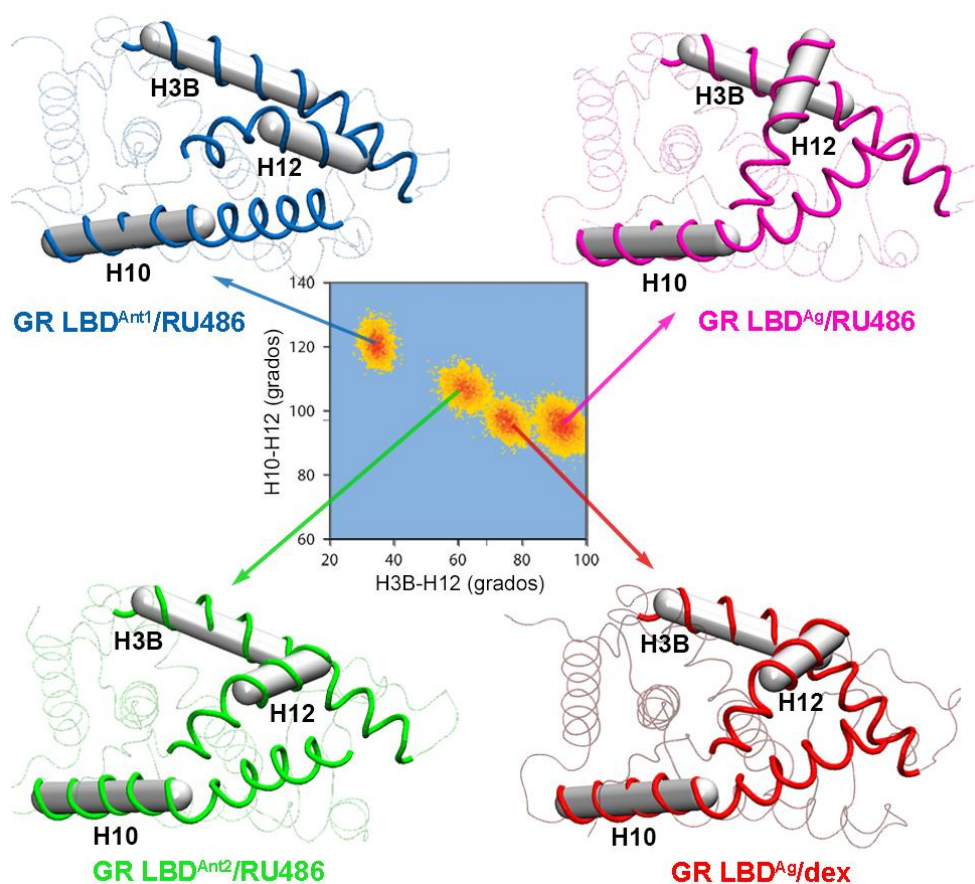


Figura 2.15. Superposición de los histogramas de los ángulos H10–H12/H3B–H12 de GR LBD^{Ag}/dex, GR LBD^{Ag}/RU486 (calculado a partir de intervalo de 500-1000 ns), GR LBD^{Ant1}/RU486 y GR LBD^{Ant2}/RU486 y sus correspondientes imágenes representativas mostrando las diferentes posiciones adoptadas por la H12.

2.4.5. Modo de unión del ligando

Seguidamente se llevó a cabo un análisis detallado del modo de unión del ligando monitoreando las interacciones por enlace de hidrógeno entre los grupos polares de Dex o de RU486 y los residuos polares del LBP. La **Figura 2.16** muestra la ocupación de enlaces de hidrógeno (HBO) entre los átomos del ligando y del receptor durante los últimos 300 ns de las trayectorias. Globalmente, en los 6 holo-sistemas, estas interacciones ligando-receptor ocurren en zonas bien caracterizadas, es decir, el grupo carbonilo C-3 y el grupo hidroxilo del C-17; además, Dex presenta enlaces de hidrógeno de larga duración a través de sus grupos hidroxilo del C-11 y C-21. El grupo carbonilo C-3 de ambos ligandos participa en una red de enlaces de hidrógeno que involucra a los

residuos Gln570 (H3) y Arg611 (H5). En el caso de Dex, mientras que para los complejos GR LBD^{Ag}/dex y GR LBD^{Ant1}/dex la interacción está mediada principalmente por una molécula de agua (lo que explica en parte los pequeños valores de HBO para Arg611), se observan contactos directos ligando-receptor para el complejo GR LBD^{Ant2}/dex. En el caso de RU486, el sistema construido a partir de GR LBD^{Ag} presenta valores similares a los de Dex para esas interacciones, mientras que para los estados no agonistas se observa poca interacción entre el ligando y Gln570, aunque un contacto más sostenido con Arg611.

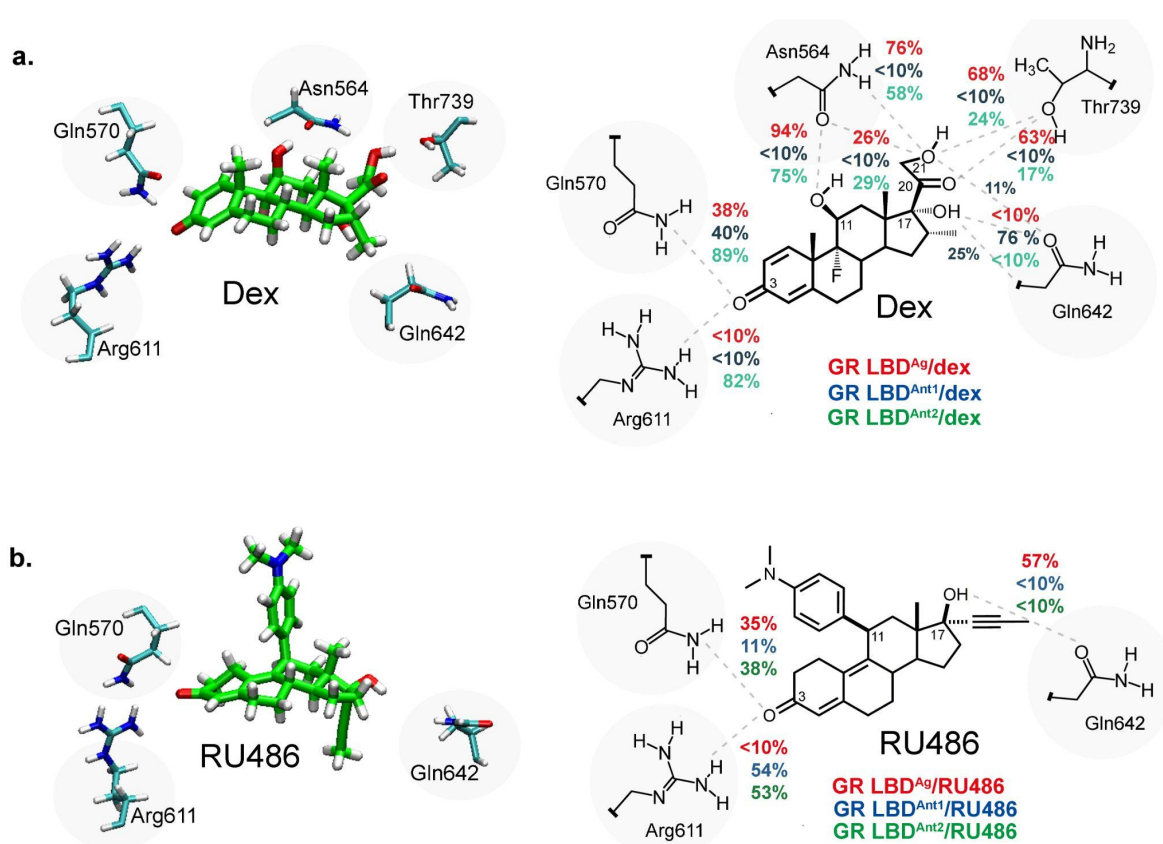


Figura 2.16. Comparación del modo de unión de los ligandos Dex (**a**) y RU486 (**b**): representación esquemática de las interacciones polares entre ligandos y el LBP de GR LBD. Se muestran los contactos de enlace de hidrógeno con líneas discontinuas. La ocupación del enlace de hidrógeno se calculó como la fracción de conformaciones de los últimos 300 ns de las simulaciones en las que ocurren esos contactos; HBO se representa como porcentaje al lado de cada línea discontinua.

Con respecto al grupo 17-hidroxilo, se forma un enlace de hidrógeno persistente con Gln642 (H7) en los sistemas GR LBD^{Ant1}/dex y, en cierta medida, en GR LBD^{Ag}/RU486. Es notable que las estructuras derivadas de cristales sólo mantienen una interacción poco frecuente con este residuo, lo que sugiere que esos contactos dentro de los complejos mencionados son forzados debido a la relación entre el tamaño y la ocupación del LBP por cada ligando: un LBP agonista más pequeño cambiaría la orientación de RU486 hacia Gln642, mientras que una conformación LBP más grande evitaría que Dex interactúe a través de sus grupos hidroxilo de C-11 y C-21 (ver más abajo), favoreciendo así este enlace.

Para los grupos hidroxilo de C-11 y C-21 de Dex, se detectan grandes valores de HBO en el estado agonista GR LBD^{Ag}, particularmente entre las parejas hidroxilo C-11/Asn564 (H3) e hidroxilo C-21/Thr739 (H11). Aunque con menor frecuencia, también están presentes en el complejo GR LBD^{Ant2}/dex; por el contrario, como se mencionó anteriormente, no se forman interacciones entre estos grupos polares y los residuos de LBP en el estado antagonista GR LBD^{Ant1}/dex. Estos hallazgos sugieren que las variaciones en la posición H12 están relacionadas con variaciones en el modo en que LBP reconoce los hidroxilos de C-11 y C-21, además de fortalecer la noción de que GR LBD^{Ant2} se asemeja a un estado intermedio entre GR LBD^{Ag} y GR LBD^{Ant1}.

Por otro lado, identificamos los residuos que contactan al sustituyente dimetilanilina de RU486 a lo largo de cada simulación (**Figura 2.17**). En los tres sistemas, este grupo voluminoso contacta con Gly567 y Gly568 (H3) y Trp600 (H4). El tercer punto de contacto, sin embargo, difiere para cada complejo: Phe749 para GR LBD^{Ag}/RU486, Leu753 para GR LBD^{Ant1}/RU486 e Ile756 para GR LBD^{Ant2}/RU486. Cabe destacar que los dos últimos pertenecen a la H12, mientras que el primero se ubica dentro del loop H11-H12, correlacionando los contactos establecidos por los residuos de H12 con el grupo dimetilanilina de RU486 y la conformación adoptada por la H12.

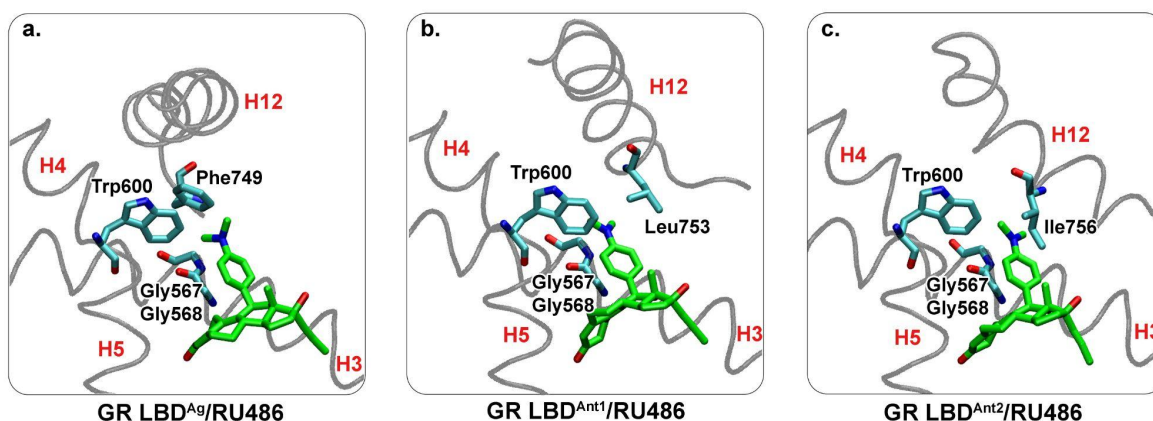


Figura 2.17. Residuos que contactan con el sustituyente dimetilanilina de RU486 en el GR LBD^{Ag}/RU486 (a), GR LBD^{Ant1}/RU486 (b) y GR LBD^{Ant2}/RU486 (c).

En general, cabe señalar que todos los sistemas se unen con al menos un residuo de la cadena H3 (que anteriormente se ha demostrado que es prácticamente invariable), mientras que otras interacciones están relacionadas en última instancia con la configuración del GR LBD (y particularmente la H12). Esto se vuelve más evidente cuando se cambian los ligandos. Por otro lado, el número de interacciones se correlaciona positivamente con la estabilidad observada en los MD. De hecho, los sistemas con interacciones más persistentes evidenciaron menos fluctuaciones que aquellos con contactos menos persistentes a lo largo de sus trayectorias, con GR LBD^{Ag}/dex representando el complejo más estable.

2.5. Simulación por MD dirigida y *Umbrella Sampling*

2.5.1. Simulación por dinámica molecular dirigida

A través de simulaciones cMD, hemos encontrado que la H12 puede adoptar numerosas posiciones dependiendo de las condiciones de LBP (es decir, identidad y ocupación del ligando), con GR LBD^{Ag}/RU486 (o pseudo-GR LBD^{Ant3}) en un extremo del espacio conformacional y GR LBD^{Ant1}/RU486 en el otro. Teniendo en cuenta las limitaciones ya mencionadas de la cMD, decidimos emplear simulaciones MD dirigidas

(SMD) para explorar posibles transiciones entre esos dos estados. En la SMD, se aplica una fuerza externa para impulsar el sistema a lo largo de una coordenada de reacción seleccionada o "variable colectiva" (CV) a una velocidad constante (Do, Lee and Le, 2018). La elección de una CV adecuada capaz de describir el camino entre dos estados de la proteína es fundamental, y por lo general, desafiante.

Al principio, considerando nuestros resultados de cMD, los ángulos H12-H3B y H12-H11A se tomaron como CV para desplazar el H12 en ausencia de ligando, pero las trayectorias procedieron con una deformación considerable en varias regiones del receptor. Luego, probamos una combinación de distancias entre átomos de C α de residuos clave de H3, H11 y H12, obteniendo también movimientos inadecuados. Otros descriptores geométricos, como combinaciones de distancias y ángulos de los residuos de las principales variables, fueron igualmente evaluados, sin resultados satisfactorios. Finalmente, al usar el RMSD de los residuos C α de H3, H11 y H12 como CV, obtuvimos un camino suave entre los estados extremos, sin deformaciones y con elementos de estructura secundaria bien conservados. La **Figura 2.18.a** muestra la evolución temporal de la CV, y la **Figura 2.18.b**, la superposición de imágenes representativas extraídas a intervalos regulares de la trayectoria SMD de 100 ns. Como se puede observar, a lo largo de la transición del pseudo-GR LBD^{Ant3} al GR LBD^{Ant1}, la H12 visita múltiples conformaciones intermedias, entre las que destacan las correspondientes a los estados originales GR LBD^{Ag} y GR LBD^{Ant2}.

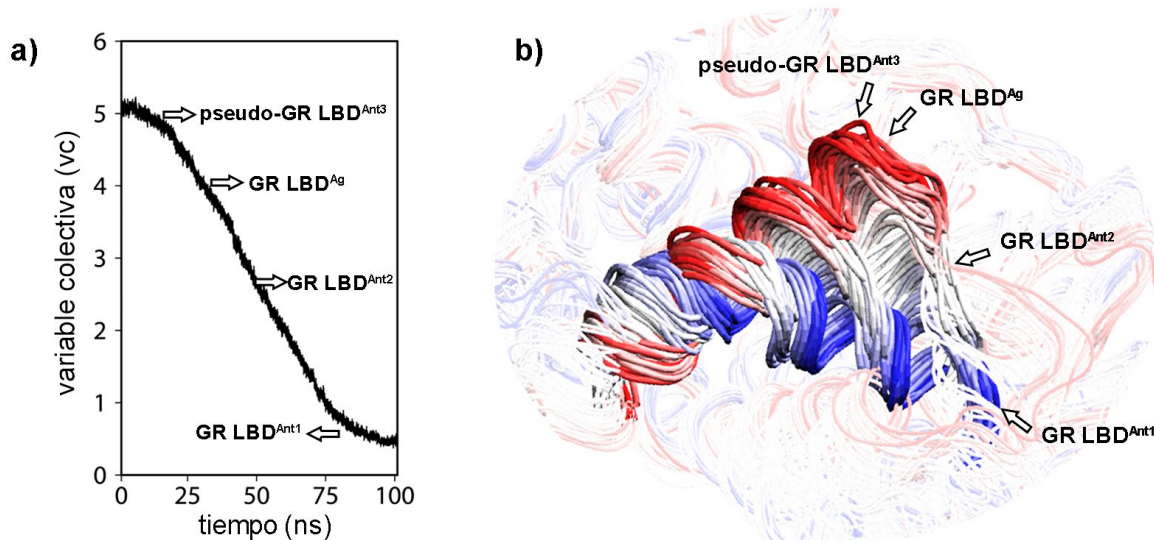


Figura 2.18. a. Evolución temporal de la variable colectiva (RMSD de los átomos de Ca de H3, H11 y H12). **b.** Superposición de 100 fotos de la trayectoria SMD, donde se destaca la H12 pasando del estado pseudo-GR LBD^{Ant3} al GR LBD^{Ant1}. En ambos gráficos, las flechas apuntan a la posición original de los sistemas GR LBD.

Las trayectorias SMD también se simularon para los complejos Dex y RU486, encontrando un comportamiento similar al del sistema apo, en el que se conservan tanto la integridad GR LBD como la estructura secundaria. Todas las trayectorias SMD se analizaron monitoreando la evolución temporal de los ángulos H3B-H12 y H10-H12 (**Figura 2.19**), encontrando sólo algunas discrepancias menores entre todos los sistemas. Por ejemplo, los valores del ángulo H3B-H12 en la primera mitad de la simulación fueron mayores en el complejo con RU486 que en los sistemas apo y Dex, como se esperaba debido al voluminoso sustituyente del antiglucocorticoide. Por otro lado, el ángulo H10-H12 mostró diferencias entre Dex y RU486 cuando se alcanzó el estado GR LBD^{Ant2}. Como control, también se realizaron trayectorias SMD en sentido inverso (desde los estados GR LBD^{Ant1} al pseudo-GR LBD^{Ant3}) en las tres condiciones (apo, Dex y RU486), encontrando un comportamiento muy similar al descrito en la otra dirección.

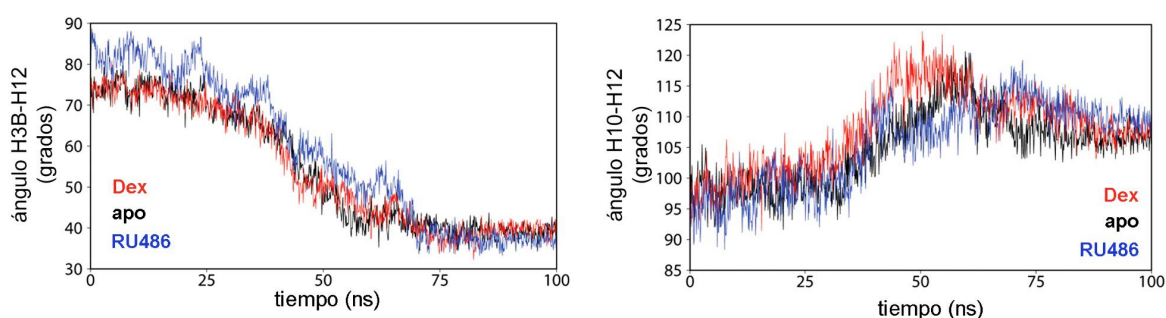


Figura 2.19. Evolución temporal de los ángulos H3B-H12 y H10-H12 para GR LBD/Dex (rojo), GR LBD/apo (negro) y GR LBD/RU486 (azul) a lo largo de simulaciones SMD.

En resumen, la variable colectiva RMSD ilustra con éxito una imagen dinámica completa del espacio conformacional muestreado por la H12 en el GR LBD. Por lo tanto, elegimos esta variable colectiva para obtener un perfil energético del espacio configuracional mediante el método de *Umbrella Sampling*.

2.5.2. *Umbrella Sampling*

Después de validar la variable colectiva adecuada para nuestros sistemas, realizamos un análisis de *Umbrella Sampling* (US) (Kästner, 2011) usando el RMSD de los átomos Ca de H3, H11 y H12 como variable colectiva. Las tres trayectorias SMD (apo, Dex y RU486) se muestrearon cada 0,2 Å de distancia a lo largo de la CV, obteniéndose 25 estados para cada sistema, que fueron equilibrados y simulados durante 3 ns. Los últimos 2 ns de cada ventana se integraron con el método *Umbrella Integration* (Kästner and Thiel, 2005).

La energía libre obtenida a través de US se graficó como una función de la CV, mostrando una clara diferencia entre los sistemas GR LBD Dex y GR LBD RU486 (**Figura 2.20**). De hecho, en presencia de Dex, se describe un mínimo profundo en $CV = 3,8 \text{ Å}$, que corresponde a la posición de la H12 en la conformación agonista (estado original GR LBD^{Ag}). Se observan grandes barreras energéticas cuando la H12 se desplaza hacia las

posiciones GR LBD^{Ant2} y pseudo-GR LBD^{Ant3} H12, lo que indica que este ligando ancla el H12 en una posición bien definida y estable. Este hallazgo sustenta la gran rigidez observada en las simulaciones de cMD y explica la actividad agonista completa de este ligando.

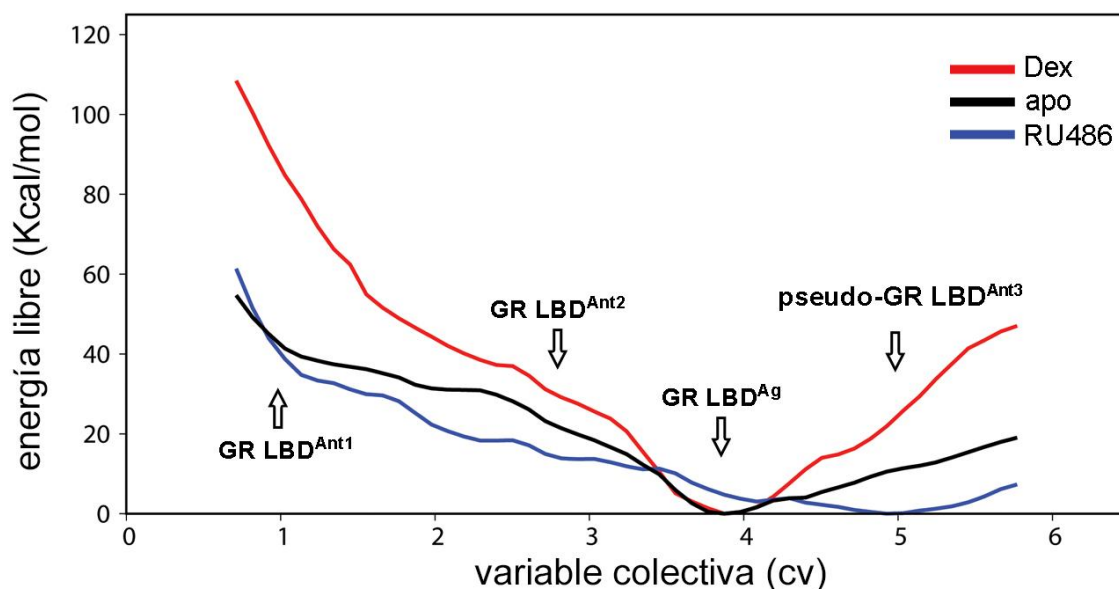


Figura 2.20. Superficie de energía libre determinada por Umbrella Sampling (GR LBD/Dex en rojo, GR LBD/RU486 en azul y GR LBD/apo en negro). Las flechas apuntan a la posición original de los sistemas GR LBD.

Por el contrario, RU486 proporciona una curva de energía libre más plana, de acuerdo con la mayor flexibilidad exhibida por los sistemas RU486 en simulaciones cMD. Se observa un mínimo global amplio en CV = 5 Å, de acuerdo con la conformación pseudo-GR LBD^{Ant3} H12. A su vez, las posiciones de la H12 en los sistemas GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2} no se correlacionan con ningún mínimo perceptible, sino con regiones planas de la superficie de energía libre. El sistema GR LBD/apo también proporciona una curva de energía libre aplanada con un ligero mínimo global en CV = ~4 Å.

2.6. Conclusión

El GR LBD conforma una estructura globular compacta cuya hélice terminal (H12) juega un papel crucial en el reclutamiento de correguladores. Empleando diferentes simulaciones por MD, nos enfocamos en descifrar la relación entre la identidad del ligando y el comportamiento dinámico de esta hélice. Incluso cuando sólo se utilizaron dos ligandos paradigmáticos para evaluar cómo afectan el espacio configuracional de la H12, consideramos que realizar simulaciones SMD seguidas de análisis de *Umbrella Sampling* es una estrategia poderosa y una herramienta potencial para comprender satisfactoriamente las bases moleculares de acción de glucocorticoides con diferentes perfiles de actividad.

En este capítulo describimos un GR LBD dinámico, capaz de explorar una amplia gama de conformaciones claramente identificadas y caracterizadas por la posición de la H12. Nuestros resultados revelan reorientaciones pronunciadas de esta hélice dependiendo de las condiciones del LBP, mientras que el resto del GR LBD sufre solo cambios modestos en el N-terminal de la H3 y el C-terminal de la H11. El análisis de la superficie potencial delineó un mínimo profundo para el sistema con Dex, lo que indica que, entre todas las conformaciones posibles, este agonista privilegia sólo unas pocas poses, lo que proporciona una gran rigidez al complejo receptor-ligando. Como consecuencia, el dominio AF-2 permanece prácticamente fijo, adecuado para reconocer a los coactivadores. Alternativamente, en presencia del antagonista RU486, la amplitud conformacional de H12 parece ser más amplia, como lo indica una energía de superficie potencial más plana sin un mínimo prominente. La mayor flexibilidad de los complejos antagonistas en comparación con los sistemas agonistas también se ha descrito para el AR (Duan *et al.*, 2016) y el ER (Ng, 2016). Además, RU486 retira la H12 del estado agonista y la coloca a ambos lados del sustituyente voluminoso del ligando. A partir de estas observaciones, proponemos que, en ausencia de correguladores, el estado de energía más bajo de H12 se alcanzaría cuando esta hélice ocupa directamente el surco AF-2.

Finalmente, al caracterizar las diferentes conformaciones de la H12, proporcionamos una serie de sistemas GR LBD que podrían representar modelos potenciales para el

diseño racional de nuevos fármacos glucocorticoides, con el objetivo final de modular finamente la actividad del GR.

CAPÍTULO 3

INTERACCIÓN CON COFACTORES

CAPÍTULO 3.

INTERACCIÓN CON CORREGULADORES

Antecedentes

3.1 Correguladores

Como se adelantó en la introducción, los correguladores son proteínas que participan en la reorganización del entorno cromatínico concomitante con el reclutamiento del TF (van der Laan and Meijer, 2008), mediando la señal entre el TF unido al ADN y la maquinaria transcripcional (**Figura 3.1**). El resultado neto de esta reorganización, es decir la apertura o condensación de la cromatina, dependerá del tipo de ligando unido al NR y el consiguiente corregulador reclutado, activando o inhibiendo la expresión génica, respectivamente. Por otro lado, hay evidencia que apunta a que cada corregulador es requerido para regular solo un grupo de genes bajo el comando de un TF específico en un tipo celular dado (Stallcup and Poulard, 2020). Como corolario, los diferentes genes blanco de un determinado TF requerirán sólo un subconjunto específico de correguladores para el control de su expresión. Esto indica que los correguladores no serían meros intermediarios sino verdaderos moduladores selectivos de la actividad de los TF.

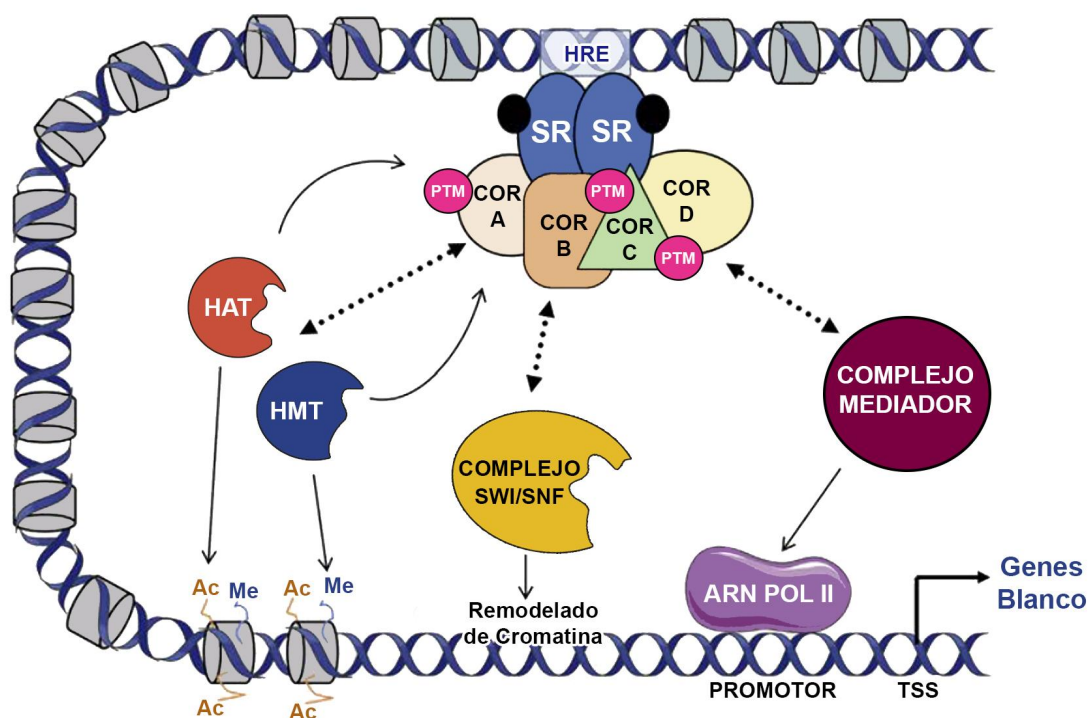


Figura 3.1. Esquema simplificado de interacción SR-correguladores. El SR activado por ligando (círculo negro) unido a un elemento de respuesta (HRE) específico modula la transcripción reclutando proteínas correceptoras que remodelan la conformación local de la cromatina, promueven la proximidad del *enhancer* al promotor y al sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen, y regulan el ensamblaje y la actividad de los complejos de transcripción en el TSS. HMT: histona metiltransferasas; HAT: histona acetiltransferasas. Complejo SWI/SNF: complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP. COR A-D: correceptores con función de soporte estructural que reclutan correceptores adicionales o componentes de la maquinaria de transcripción basal tal como el complejo Mediador, que a su vez recluta a la ARN polimerasa II en TSS. Modificado de (Stallcup and Poulard, 2020).

En particular, el GR interacciona con la familia de proteínas p160 o *Steroid Receptor Coactivator* (SRC), cuya función es de andamiaje o soporte estructural para la interacción con otras proteínas. Esta familia está integrada por tres miembros: NCoA-1 (o SRC-1); NCoA-2 (SRC-2, TIF-2 o GRIP1); y NCoA-3 (SRC-3, CIP, AIB1, ACTR o TRAM1). El GR interactúa con estas proteínas a través de su dominio AF-1 (en el N-terminal), el AF-2 (en el GR LBD) o ambos, y diversos estudios describen una interacción preferencial con

NCoA-2 sobre los otros miembros de p160 (Kurihara *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Ronacher *et al.*, 2009).

En conjunto, los NCoA se expresan abundantemente en diversos tejidos e intervienen en la regulación de casi todos los aspectos de la expresión génica. Además, se ha demostrado que los tres miembros de esta familia están involucrados en distintos aspectos del proceso de tumorigénesis (Kumar, 2021). Las proteínas NCoA contienen tres dominios funcionales: un dominio N-terminal que se une al dominio AF-1 de los SRs, aumentando su estabilidad y contenido α -helicoidal; un dominio central de interacción con receptores nucleares (*nuclear receptor interaction domain*, NRID), que contiene tres o cuatro motivos LxxLL (las *cajas NR*) y que interacciona con el dominio AF-2 del LBD; y los dominios de activación C-terminal, que interactúan con HATs y HMTs (**Figura 3.2**).

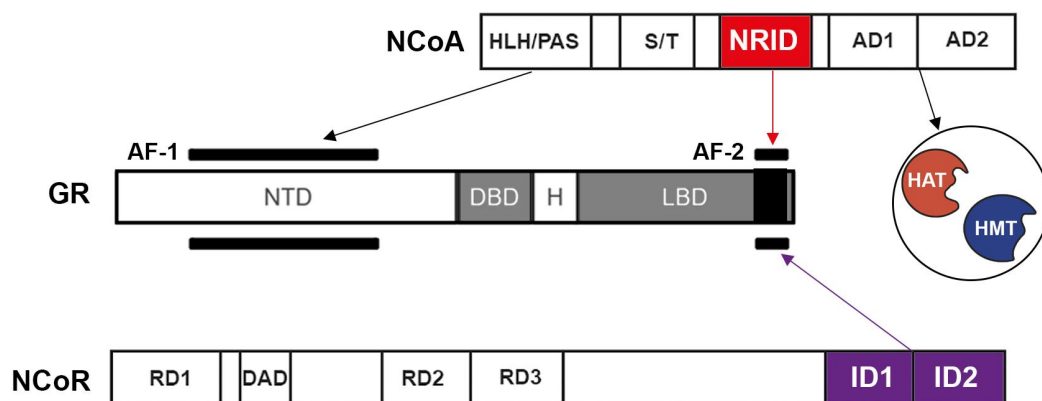


Figura 3.2. Representación esquemática de GR y correguladores de las familias NCoA y NCoR. **NCoA.** Se indica: en rojo el dominio NRID (dominio de interacción con NR con 3 motivos LxxLL) que interactúa con el AF-2 del GR LBD; interacción del dominio N-terminal HLH/HPAS con la región AF-1 del GR DBD, y la interacción de los dominios C-terminales AD1 y AD2 con HATs y HMTs. **NCoR.** Se indica en violeta los dominios ID1 e ID2 (dominio de interacción con NR con motivos (L/I)XX(I/V)I o LXXX(I/L)XXX(I/L)) (Cain and Cidlowski, 2015; Stallcup and Poulard, 2020; Sun and Xu, 2020).

Por otro lado, los NRs también tienen la capacidad de interactuar con correpresores, factores participantes centrales en la inhibición de la expresión génica y

cuya disfunción puede asociarse a diversas patologías (Weikum *et al.*, 2017). Dentro de las familias de correpresores que interactúan con GR se encuentran NCoR1 (*Nuclear receptor Corepressor*) y SMRT (*Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor* o NCoR2). Estas proteínas presentan motivos (L/I)XX(I/V)I o LXXX(I/L)XXX(I/L), denominados cajas de correpresores de receptores nucleares (CoRNR), que forman una hélice extendida en comparación con la hélice LXXLL de los coactivadores, pero que es reconocida por el mismo dominio AF-2 de los SR LBD (**Figura 3.2**).

Los niveles de expresión de cada corre regulador dependen del tipo tisular y del contexto celular. A su vez, los diferentes ligandos de los SRs, al modular la posición de la H12, determinarían el *perfil de reclutamiento* de corre reguladores de cada complejo, favoreciendo la interacción con coactivadores y correpresores según el *perfil de actividad* de cada ligando. En consecuencia, dilucidar las bases moleculares subyacentes al reconocimiento e interacción entre los distintos corre reguladores y el GR unido a un ligando dado resulta esencial para comprender y predecir los efectos farmacológicos específicos mediados por GR en diferentes órganos y tejidos. Además, la posibilidad de dirigir la acción de un TF (como el GR) mediante la modulación de corre reguladores específicos abre nuevas oportunidades en la regulación de los efectos farmacológicos del complejo TF-ligando, pudiendo en última instancia discriminar y seleccionar efectos terapéuticos deseados de aquellos adversos.

Interacción entre el GR LBD y los corre reguladores

Las regiones proteicas que incluyen los motivos conservados de cada tipo de corre regulador presentan una estructura helicoidal característica que permite su interacción con la región AF-2 del LBD del GR (**Figura 3.3**). El dominio AF-2 es un surco principalmente hidrofóbico formado por residuos de las hélices H3, H4 y H12. Por un lado, el dominio AF-2 interactúa con los residuos leucinas no polares de los motivos LxxLL e I/LxxII, los cuales están dispuestos en un mismo lado de la hélice anfipática. Por otro lado, existe un segundo tipo de interacción más específica, denominada *charge-clamp*, entre residuos polares del GR y del corre regulador. Esta interacción

estabiliza la asociación entre las dos proteínas (Veleiro *et al.*, 2010) (**Figura 3.3 a y b**). Así, la identidad de los residuos adyacentes y centrales de la caja NR interviene en la selectividad del GR por los distintos correguladores y sus motivos. Por ejemplo, el GR muestra selectividad por el tercer motivo del NCoA-2, el cual se caracteriza por ofrecer un residuo arginina en posición +6 disponible para formar un puente salino con el Asp590 del GR LBD (**Figura 3.3.a**) (Bledsoe *et al.*, 2002). En el caso del correpresor NCoR-1, es un ácido glutámico en posición +2 el que forma una interacción polar específica con la Gln597 del GR LBD (**Figura 3.3.b**).

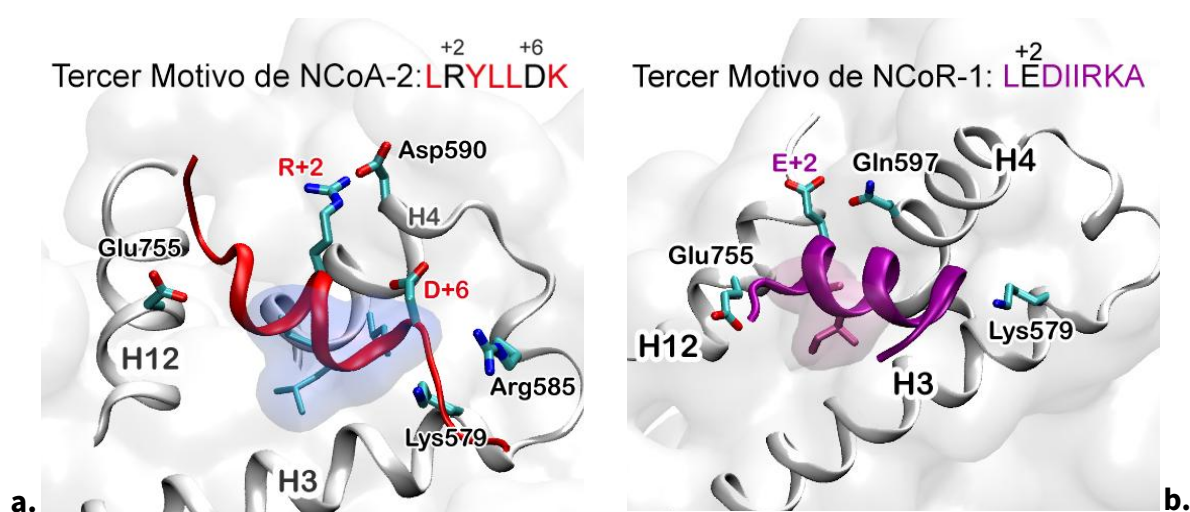


Figura 3.3. a. Complejo GR LBD-Dex-NCoA2 (PDB:1m2z, cadenas Ay B). Reconocimiento del motivo del coactivador (rojo) por el GR LBD. Se muestran los residuos polares de GR que forman *charge clamps*: Lys579, Arg585, Asp590 y Glu755. La región central es el hueco hidrofóbico del AF-2 (azul claro) y recibe las cadenas laterales no polares de los residuos de leucina del coactivador. **b.** Complejo GR LBD-RU486-NCoR-1 (PDB ID:3h52, cadenas A y N). Reconocimiento del motivo del correpresor NCoR-1 (violeta claro). Lys579 mantiene la interacción con el extremo C del motivo de NCoR; Glu755 se aleja del N terminal rompiendo la *charge-clamp*. Las interacciones de las cadenas laterales de leucina con la cavidad hidrofóbica en el GR LBD se conservan (región de color naranja claro en el centro) y aparece una nueva interacción entre Gln597 y una cadena lateral de ácido glutámico en el motivo NCoR. Modificado de (Veleiro *et al.*, 2010).

Varios estudios han demostrado que la flexibilidad conformacional y la dinámica dentro del LBD, especialmente alrededor de la región AF-2, desempeñan un papel crítico en la formación del complejo GR-corregulador (Kumar, 2021). Como vimos anteriormente, la estructura del ligando determina el equilibrio dinámico de la H12, incidiendo entonces en ambas clases de interacciones, de tipo polar y no polar, entre el GR y los correguladores. Por un lado, al variar la posición de la H12 respecto a las H3 y H4, se modifica la dimensión de la cavidad hidrofóbica que interactúa con las leucinas de la caja NR. Por el otro, al cambiar la posición del residuo Glu755 (H12), se ven afectadas las interacciones *charge-clamp* involucradas en la selectividad del GR por cada caja NR.

Diferentes abordajes experimentales han sido aplicados para evaluar la interacción entre el GR y los correguladores. Por ejemplo, *Yeast two-hybrid analysis* (Y2H), co-IP (Birth *et al.*, 2017) (Yoshinaga *et al.*, 1992), FRET, pbFRET y FRAP (Agresti *et al.*, 2005), FCS (Stortz *et al.*, 2017), SMT (*single molecule tracking*) (Paakinaho *et al.*, 2017) (Gebhardt *et al.*, 2013). En este trabajo, aplicamos la tecnología de microarreglos de péptidos MARCoNI (*Microarray Assay for Realtime Coregulator-Nuclear receptor Interaction*) para evaluar el perfil de interacciones a correguladores del GR unido a diferentes ligandos.

3.2. Microarreglos de péptidos MARCoNI

La tecnología de microarreglos de péptidos MARCoNI ha sido desarrollada específicamente para identificar y analizar las interacciones entre péptidos conteniendo los motivos de interacción a NRs y el LBD de los NRs unido o no a determinados ligandos. El ensayo se lleva a cabo en un *microarray* que consta de péptidos únicos derivados de correguladores de NRs. Cada péptido contiene un motivo de unión a NR incluyendo secuencias LXXLL o LXXXIXXXL, que forman parte de proteínas coactivadoras o correpresoras conocidas, respectivamente (Koppen, Houtman and Pijnenburg, 2009). En total, 67 proteínas están representadas por estos péptidos. El NR a estudiar se estimula y se pone en contacto con el *arreglo de péptidos*, donde se incuba e interactúa selectivamente con los péptidos inmovilizados. Las interacciones entre péptidos y NRs

se visualizan mediante marcación con anticuerpos fluorescentes dirigidos contra el NR. El ensayo MARCoNI detecta la unión del NR LBD a motivos NR, y permite la resolución del perfil de correguladores para un NR en un entorno específico, por ejemplo, en células estimuladas con un ligando de interés (**Figura 3.4**).

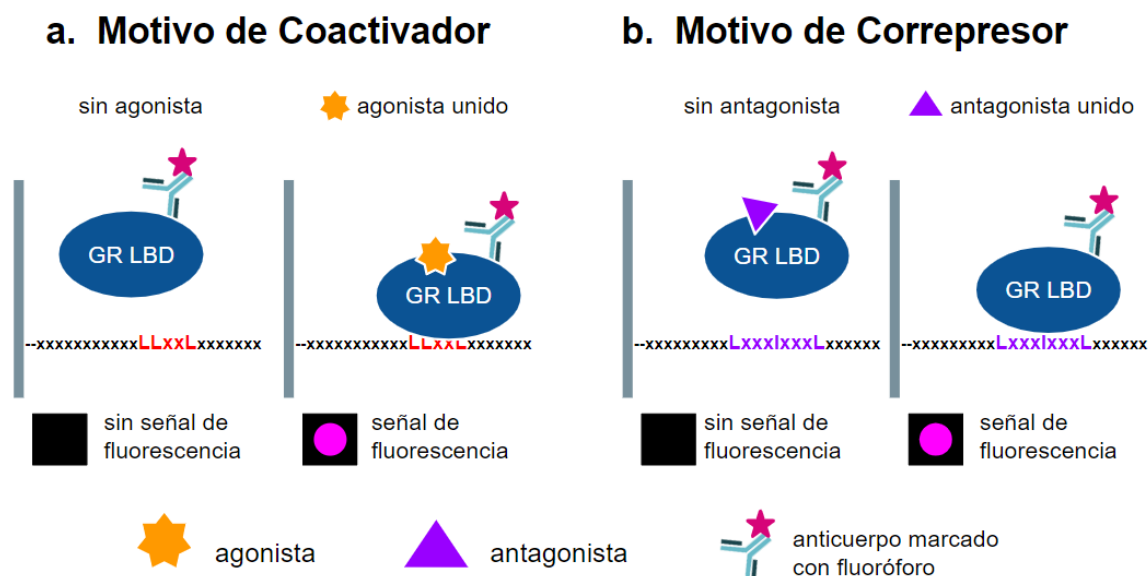


Figura 3.4 Esquema simplificado del ensayo MARCoNI. La unión de un ligando al GR LBD favorece las interacciones con péptidos que presenten motivos de coactivador (**a**) o de correpresor (**b**). El reconocimiento de este complejo por un anticuerpo marcado con fluoróforo emite una señal de fluorescencia en el punto correspondiente del microarreglo. Modificado de (Beekmann *et al.*, 2015).

3.3. Análogos rígidos de glucocorticoides

En el desarrollo de nuevos fármacos moduladores de SRs, una estrategia para aumentar la especificidad de un ligando esteroideo por un SR particular es la selección y fijación de ciertas conformaciones del esteroide, disminuyendo la flexibilidad intrínseca de su esqueleto carbonado (Pecci *et al.*, 2009). Con este objetivo, hace más de dos décadas el grupo de investigación del Dr. G. Burton (Dpto. de Química Orgánica, UMYMFOR, FCEN-UBA) diseñó y sintetizó diversos compuestos análogos rígidos de

hormonas esteroideas, obteniendo dos compuestos de potencial relevancia farmacológica: 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21OH-6,19OP) y su derivado 21-hemisuccinoiloxi-6,19-epoxiprogesterona (21HS-6,19OP) (**Figura 3.5**). Las propiedades glucocorticoides de estos análogos fueron intensamente estudiadas por el grupo (Alvarez, Martí, Veleiro, Presman, *et al.*, 2008) (Alvarez, Martí, Veleiro, Misico, *et al.*, 2008) (Presman *et al.*, 2010), encontrando que el compuesto 21OH-6,19OP reviste interés farmacológico dadas sus acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras y ausencia de varias reacciones adversas de los GC (Pecci *et al.*, 2018). Además, estos compuestos resultaron herramientas moleculares muy valiosas para la investigación de la acción del GR y sus mecanismos moleculares subyacentes.

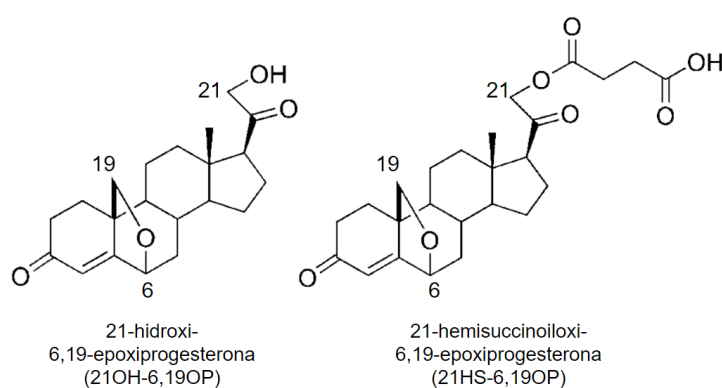


Figura 3.5 Estructura de los análogos rígidos de GC 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP.

La determinación del efecto como glucocorticoide de estos compuestos demandó diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados establecieron que 21OH-6,19OP posee selectividad por GR pero no por PR o MR, antagonizando la acción directa de los agonistas. Por su parte, su derivado 21HS-6,19OP, retiene la especificidad por GR, pero con actividad glucocorticoidea moderada (Alvarez, Martí, Veleiro, Misico, *et al.*, 2008). Estas características se evidenciaron, por ejemplo, en la evaluación de su actividad biológica mediante ensayos utilizando el gen reportero MMTV-Luc en células Cos-1 (**Figura 3.6**). En efecto, se observó que 21OH-6,19OP no induce la expresión de la luciferasa, pero inhibe la inducción provocada por Dex, actuando como un antagonista. Por su parte, 21HS-6,19OP funciona como agonista parcial, sin alcanzar la eficacia ni la potencia de Dex (Alvarez, Martí, Veleiro, Misico, *et al.*, 2008).

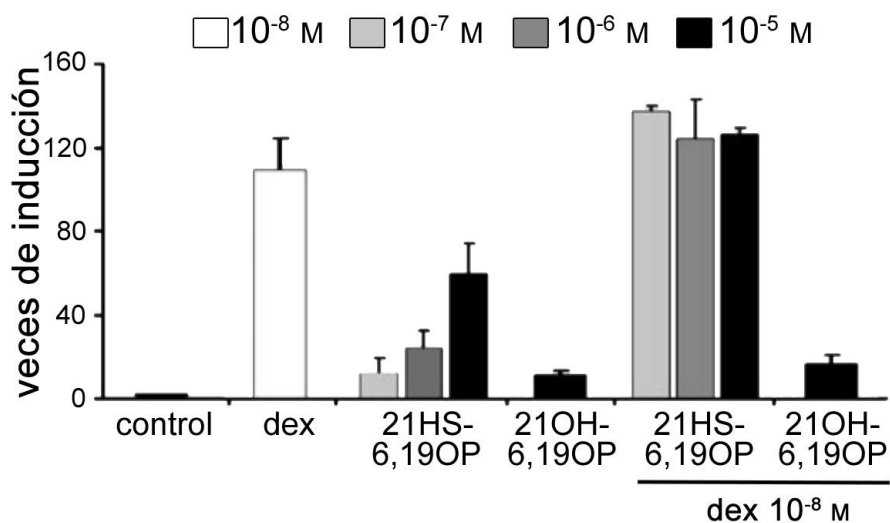


Figura 3.6. Actividad de luciferasa en respuesta al tratamiento con los ligandos rígidos 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP. Células Cos-1 se co-transfectaron con el vector pRSV-hGR (1 µg), el vector reportero pMMTV-Luc (3 µg) y el vector pCMV-LacZ (1 µg). Las células se incubaron durante 24 h como se indica, y se midió la actividad de la luciferasa y se normalizó por la actividad de la β-galactosidasa. Los valores se expresan como veces de inducción relativos al control (células no tratadas). Los datos representan la media ±SE de tres experimentos independientes. Modificado de (Alvarez, Martí, Veleiro, Misico, *et al.*, 2008).

Además, resultados previos del laboratorio mostraron, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas, que el complejo GR/21HS-6,19OP es capaz de co-precipitar con NCoA-2 mientras que el complejo GR/21OH-6,19OP, no (Presman *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos resultados, en esta Tesis decidimos extender el análisis de la interacción entre el GR unido a cada uno de estos ligandos y los correguladores, utilizando el arreglo de péptidos MARCoNI en busca de identificar perfiles de interacción específicos de cada ligando en particular. Además utilizamos un método de simulación de *docking* proteína-péptido para investigar el modo de unión entre los péptidos y el complejo GR LBD/Dex y determinar la energía de interacción involucradas.

Resultados

3.4. Dimensión del dominio AF-2 de GR LBD en simulaciones cMD

Como primera aproximación en busca de estudiar la relación entre la estructura del ligando unido al receptor y la interacción de dicho complejo con corre reguladores, usamos las simulaciones por cMD de los complejos GR LBD/Dex y GR LBD/RU486 presentadas en el capítulo 2, para evaluar cómo los cambios conformacionales observado en la H12 afectan la configuración del dominio AF-2. Para ello calculamos la distancia promedio entre los átomos C α de Glu755 (H12), Lys579 (H3) y Asp590 (H4) (**Tabla 3.1** y **Figura 3.7**).

Sistema	Receptor	Ligando	Distancia entre C α (Å)		
			Glu755-Lys579	Glu755-Asp590	Asp590-Lys579
1	GR LBD ^{Ag}	Dex	18.4	15.0	11.8
2	GR LBD ^{Ag}	-	18.3	15.0	11.7
3	GR LBD ^{Ag}	RU486	17.8	12.9	11.9
4	GR LBD ^{Ant1}	RU486	22.2	21.6	12.0
5	GR LBD ^{Ant1}	-	21.5	20.4	11.7
6	GR LBD ^{Ant1}	Dex	20.5	20.2	11.9
7	GR LBD ^{Ant2}	RU486	20.1	16.6	11.6
8	GR LBD ^{Ant2}	-	18.5	15.5	11.4
9	GR LBD ^{Ant2}	Dex	18.4	15.2	11.4

Tabla 3.1. Distancias promedio entre residuos que forman el *charge-clamp*.

Como se mencionó, estos residuos participan en el anclaje del corre regulador al receptor a través de interacciones polares *charge-clamp*, por lo tanto, la posición relativa entre estos tres residuos determina la dimensión de la apertura del dominio AF-2. En concordancia con los resultados descritos en el capítulo 2, la distancia Lys579 (H3)-Asp590(H4) se mantuvo previsiblemente constante en los nueve sistemas

simulados, indicando una permanencia de la disposición relativa de este punto de anclaje para el corregulador. En contraste, las distancias involucrando al residuo localizado en la H12 presentaron grandes variaciones. Se determinaron diferencias de hasta 4,4 Å y 7,5 Å para los pares Lys579-Glu755 y Asp590-Glu755 respectivamente, con GR LBD^{Ag}/RU486 y GR LBD^{Ant1}/RU486 en los extremos.

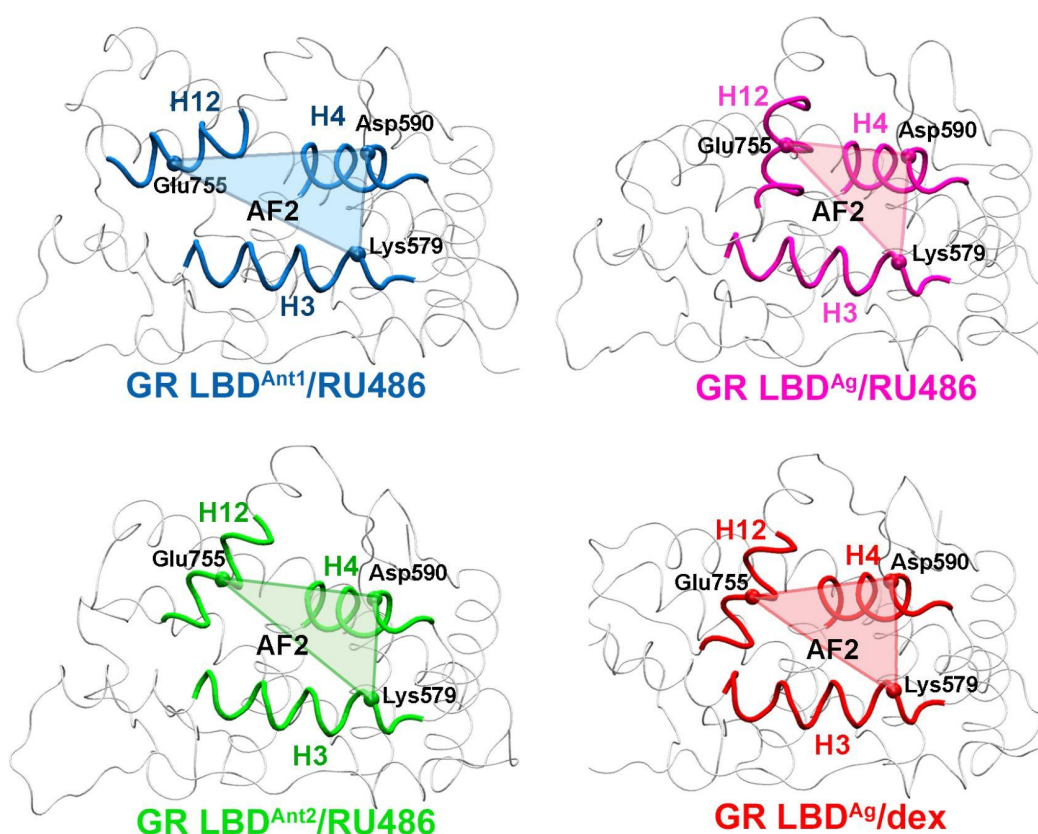


Figura 3.7. Conformación del dominio AF-2 por las hélices 3, 4 y 12, en los 4 sistemas representativos descritos en el Capítulo 2. Los átomos Ca de los residuos involucrados en las interacciones de tipo *charge-clamp* (Lys579, Asp590 y Glu755) se representan con esferas sobre las hélices respectivas y con líneas continuas, la distancia entre ellos. Se observa que la superficie triangular que delimitan varía en área de un sistema a otro, lo que se correlaciona con la variación en el volumen del dominio AF-2.

De esta manera observamos que las dimensiones y los puntos de anclaje del dominio AF-2 dependen fuertemente de la configuración espacial de la H12, la cual a su vez, como describimos anteriormente, está dada por las características estructurales del ligando alojado en el LBP del receptor.

3.5. Estudio de la interacción del GR con corre reguladores mediante microarreglos de péptidos

En busca de obtener un perfil de reclutamiento de diversos corre reguladores del GR unido a distintos ligandos, en colaboración con Onno C. Meijer (Leiden University Medical Center, Países Bajos), Gerardo Burton (UMYMFOR-CONICET-UBA) y René Houtman (PamGene International, Países Bajos), se llevó a cabo un ensayo de interacción del GR LBD (estimulado con Dex, RU486, y los análogos rígidos 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP) con péptidos conteniendo los motivos correspondientes a distintos corre reguladores, ordenados espacialmente (PamGene International, #88101). Los resultados de este experimento nos fueron proporcionados en formato numérico en una planilla de cálculo, como también representados en un gráfico cartesiano y un mapa de calor (**Figura 3.8**), donde cada punto en el eje de ordenadas corresponde a un péptido. El eje de abscisas y la escala de color representan el valor de índice de modulación (*modulation index*, MI) obtenido para cada péptido y ligando ensayado, y que corresponde al logaritmo del cociente entre la fluorescencia detectada para el complejo GR LBD/ligando y la fluorescencia obtenida para GR LBD sin ligando:

$$MI = \log_{10} \left(\frac{\text{fluorescencia LBD-Ligando}}{\text{fluorescencia LBD-vehículo}} \right)$$

De esta manera, podemos obtener información respecto de las afinidades relativas de unión de una variedad de corre reguladores, discriminadas además por caja de NR o por caja CoRNR de cada proteína analizada.

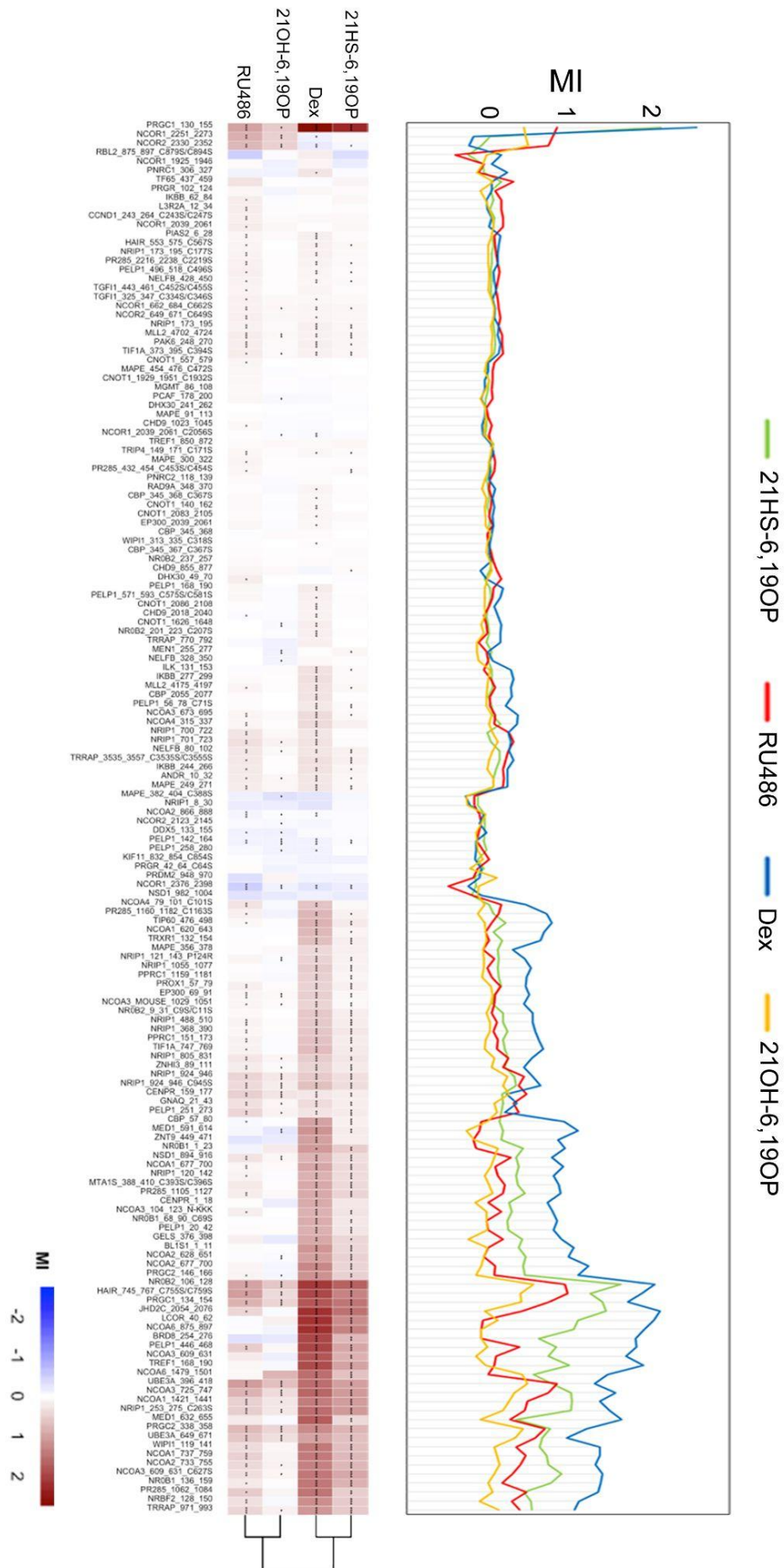


Figura 3.8 (página anterior). Perfil de unión al GR LBD de los péptidos obtenido mediante la tecnología de microarreglos de péptidos MARCoNI. Abajo se representa el agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) de los resultados.

El estudio comparativo de los MI de GR-Dex (azul) y GR-RU486 (rojo) con los de 21OH-6,19OP (naranja) y 21HS-6,19OP (verde) (**Figura 3.8**) reveló que el perfil de unión de péptidos de 21OH-6,19OP es muy similar al de RU486, mientras que el de 21HS-6,19OP se asemeja al de Dex, aunque con valores máximos de MI menores. Esta misma relación se refleja en el mapa de calor (**Figura 3.8**), donde el dendograma muestra que GR-Dex y GR-21HS-6,19OP se agrupan en la misma subcategoría, mientras que la otra reúne a GR-RU486 y GR-21OH-6,19OP.

Estos resultados son más evidentes en la **Figura 3.9**, donde se reorganizaron los péptidos en orden creciente de MI_{Dex} y se contrasta de a pares el perfil de reclutamiento de GR-RU486, GR-21HS-6,19OP y GR-21OH-6,19OP con el de GR-Dex. Se observa que las curvas de Dex y 21HS-6,19OP presentan un perfil similar (**Figura 3.9.b**), mientras que tanto RU486 como 21OH-6,19OP presentan un perfil distinto a Dex (**Figura 3.9.a y c**) pero muy semejantes entre sí (**Figura 3.9.d**).

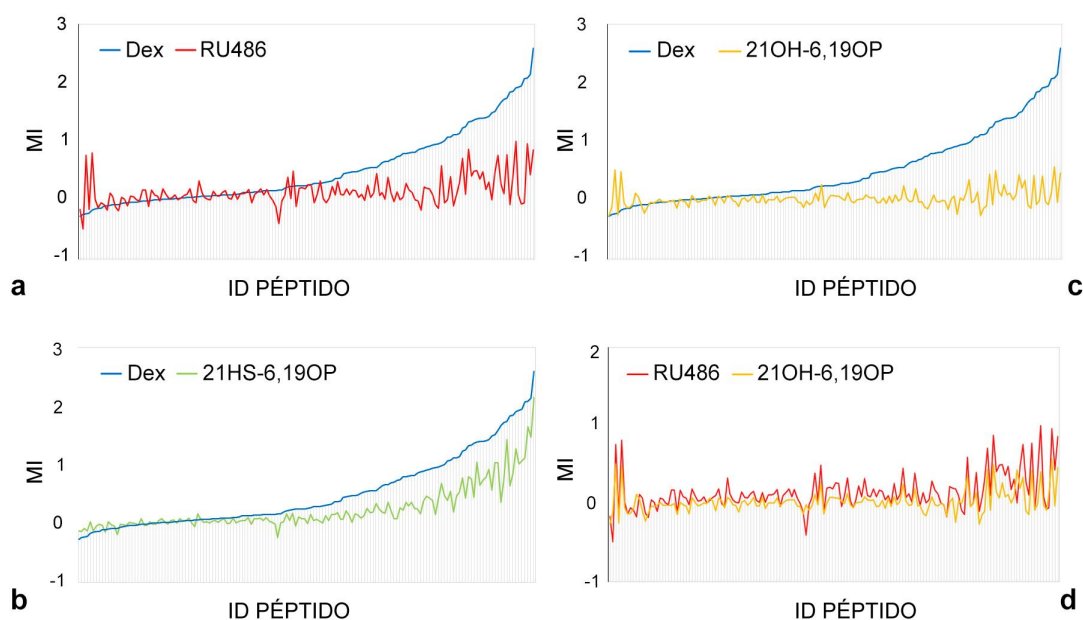


Figura 3.9. Perfil de unión a GR LBD de los péptidos obtenido mediante el ensayo de MARCoNI. Se comparan los perfiles de reclutamiento de GR-Dex con los otros ligandos (**a, b y c**) y de RU486 con 21OH-6,19OP (**d**).

De esta manera, se puede establecer una relación entre el perfil de reclutamiento global de péptidos correguladores obtenido en el ensayo MARCoNI, es decir, el tipo de péptido al cual se une el complejo GR-ligando, y la actividad biológica de ese complejo, expresada, por ejemplo, como su capacidad de estimular la expresión del gen reportero pMMTV-LUC al interactuar con GR (**Figura 3.6**).

Con el objetivo de realizar un análisis particular sobre los coactivadores y correpresores clásicos, NCoA y NCoR, respectivamente, graficamos el MI obtenido para las distintas cajas, NR o CoRNR, con cada ligando (**Figura 3.10**). De acuerdo a lo esperable, los compuestos con actividad agonista, Dex y 21HS-6,19OP, reclutan preferentemente péptidos correspondientes a secuencias de coactivadores, mientras que no inducen la unión, o incluso la desfavorecen, de péptidos correspondientes a correpresores. Un comportamiento inverso se observa para los compuestos con función antagonista de los efectos de Dex: RU486 y 21OH-6,19OP (**Figura 3.10**). Por otro lado, como mencionamos anteriormente, estudios funcionales de los motivos LxxLL del NCoA2 indicaron que la unión del GR al tercer motivo es más afín que a los restantes (Bledsoe *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos mediante el análisis de interacción realizado con el microarreglo de péptidos siguen esa tendencia (**Figura 3.10a**).

Así, tanto el análisis global como uno más detallado sobre un dado corregulador, sugieren que los resultados obtenidos por MARCoNI se ajustan a la evidencia existente sobre la unión de correguladores a los complejos GR-Dex y GR-RU486.

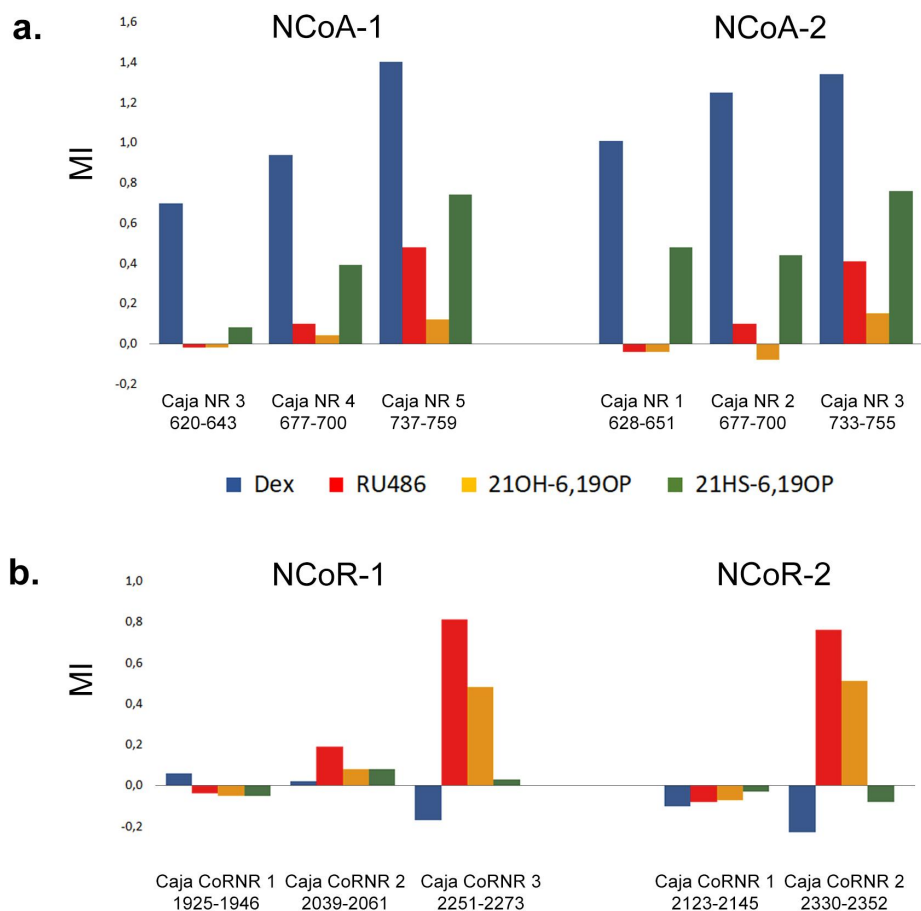


Figura 3.10. Interacción entre correguladores y GR LBD unido a Dex, RU486, 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP, indicada como MI. **a.** Péptidos correspondientes a los coactivadores NCoA-1 (cajas NR 3, 4 y 5) y NCoA-2 (cajas NR 1, 2 y 3). **b.** Péptidos correspondientes a los correpresores NCoR-1 (cajas CoRNR 1, 2 y 3) y NCoR-2 (cajas CoRNR 1 y 2).

3.6. Estudio de motivos de secuencia

Para realizar un análisis comparativo de secuencias, clasificamos los péptidos en dos grupos: grupo A con todos los péptidos (27) que exhibieron un MI_{Dex} significativamente mayor a 1 y grupo B con todos los péptidos (18) con un MI_{Dex} que no difiere de cero. De esta manera caracterizamos un grupo en el cual Dex induce la unión del péptido al GR LBD, y otro grupo en el cual este ligando no muestra influencia sobre dicha unión. Para cada grupo por separado se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias desde

la posición -2 a la posición 8 respecto del motivo LxxLL, y luego se obtuvo el logo correspondiente (Crooks *et al.*, 2004) (**Figura 3.11**). Se desea identificar así posibles posiciones con algún grado de conservación en los flancos o en la parte central de los motivos LxxLL que pudieran relacionarse con las diferentes afinidades observadas en el ensayo *in vitro*. La comparación de los logos revela que en el grupo A, además de los residuos leucinas del motivo LxxLL, prácticamente todas las posiciones poseen cierto contenido de información. En cambio, para el grupo B no se distinguen posiciones relevantes, excepto la posición +6 donde, a diferencia del grupo A, se destaca la presencia de un residuo básico.

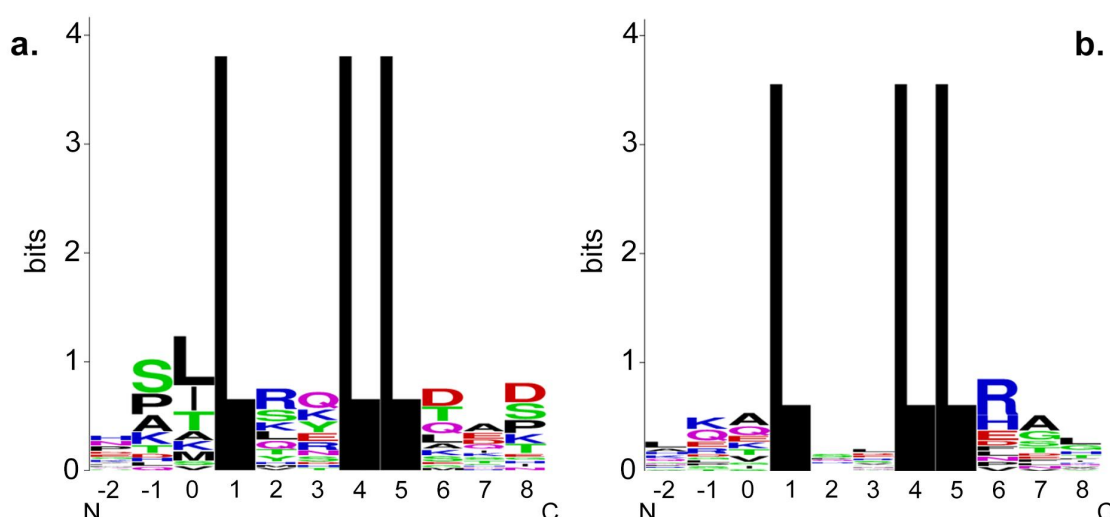


Figura 3.11. Logo de secuencias de los diferentes péptidos alineados. Se muestra el motivo LxxLL en el centro y 3 aminoácidos hacia cada extremo. **a.** 27 péptidos del grupo A con un MI_{Dex} significativamente mayor a 1. **b.** 18 péptidos del grupo B con un MI_{Dex} que no difiere de 0.

El logo obtenido para el grupo A indica una alta frecuencia de residuos básicos (Arg y Lys) en posición +2, lo cual, como vimos anteriormente, estaría relacionado a la formación de interacciones por puente salino entre este residuo y el Asp590 del GR LBD (**Figura 3.3.a**). La posición +3, por su parte, está poblada principalmente por aminoácidos polares (Gln, Lys, Tyr, Glu). La posición +6 muestra una prevalencia de residuos ácidos (Asp) o polares (Thr y Gln), posiblemente dirigida por la presencia de la Arg585 en el GR LBD (**Figura 3.3.a**). En el otro extremo de la secuencia, se observa una

alta frecuencia de residuos no polares (Leu e Ile) en posición 0 y de un residuo polar (Ser) en posición -1. Finalmente, la presencia de un residuo básico en la posición +6 observada en el logo del grupo B podría explicarse al considerar una posible repulsión entre cargas positivas con la Arg585 del GR LBD.

La afinidad del péptido por el receptor dependerá de la combinación de interacciones que puedan establecerse entre los residuos en cada una de estas posiciones y los residuos del GR LBD. El análisis de las secuencias de péptidos cuya unión es inducida por Dex y de péptidos cuya unión no se afecta por este ligando, sugiere que es posible reconocer ciertas características estructurales en determinadas posiciones que favorecen la unión. En este sentido, la aplicación de métodos computacionales que permitan evaluar la unión entre el complejo GR/Dex y el péptido podrían resultar de utilidad para comprender si cada una de las interacciones posibles efectivamente se forman, de qué modo, y cómo contribuyen a la energía de interacción total.

3.7. Docking proteína-péptido. Rosetta FlexPepDock

Para el análisis *in silico* de la interacción entre los péptidos correguladores y el GR LBD, optamos por un método de *docking* péptido-proteína, utilizando el protocolo de refinamiento FlexPepDock del programa de libre acceso Rosetta (Raveh, London and Schueler-Furman, 2010). Este protocolo crea modelos de alta resolución de complejos entre péptidos flexibles y proteínas globulares, como es nuestro caso de estudio.

FlexPepDock está diseñado para situaciones en las que se encuentra disponible un modelo aproximado de la interacción péptido-proteína, requiriendo una estructura inicial en formato PDB de dicho complejo, con o sin coordenadas de las cadenas laterales. Idealmente, los péptidos a utilizar deben ser de entre 5 y 15 aminoácidos de longitud. En nuestro caso, utilizamos como estructura inicial la depositada en el Protein Data Bank del GR-LBD unido a Dex (PDB ID: 1m2z). Este archivo corresponde a un GR-LBD unido al tercer motivo LxxLL del coactivador NCoA-2, proporcionando entonces

las coordenadas iniciales necesarias tanto de la proteína globular como del péptido coactivador para usar como modelo inicial.

Luego, se reunieron en formato FASTA las secuencias peptídicas correspondientes al microarreglo de péptidos utilizado y se las alineó mediante la herramienta COBALT (*Constraint-Based Alignment Tool*) que permite el alineamiento de múltiples secuencias de proteínas (Papadopoulos and Agarwala, 2007). Sobre ese resultado, se realizó un curado manual con el objetivo de que todas las secuencias LxxLL queden alineadas. Finalmente, se seleccionó un grupo representativo de 11 péptidos correguladores con motivo coactivador LxxLL, tomando como referencia el MI_{Dex} obtenido en el ensayo *in vitro*. El criterio de selección fue tal que para la muestra los valores de MI_{Dex} fueran positivos y aproximadamente equidistantes (**Figura 3.12**).

Ante la pregunta de cuántos aminoácidos deberían contener los fragmentos a evaluar, se contemplaron los 5 propios del motivo LxxLL, 5 en el extremo C-terminal (coincidiendo en algunos casos con el total de aminoácidos en ese extremo) y 5, 7 u 11 aminoácidos hacia el N-terminal. El objetivo de estas diferentes longitudes fue evaluar posibles efectos sobre la energía de interacción. Una vez alineados y seleccionados los péptidos, se inició el algoritmo de búsqueda con las 3 longitudes de secuencia de aminoácidos. Para cada caso se obtuvieron 1000 poses, de las cuales se seleccionó la más favorable para la comparación de energía. No observamos que la longitud del flanco N-terminal tuviera efectos apreciables sobre el *docking* del péptido, obteniéndose energías de interacción muy similares para las tres longitudes evaluadas. Por lo tanto, a partir de aquí se continuó trabajando con los valores obtenidos para los fragmentos de 17 aminoácidos.

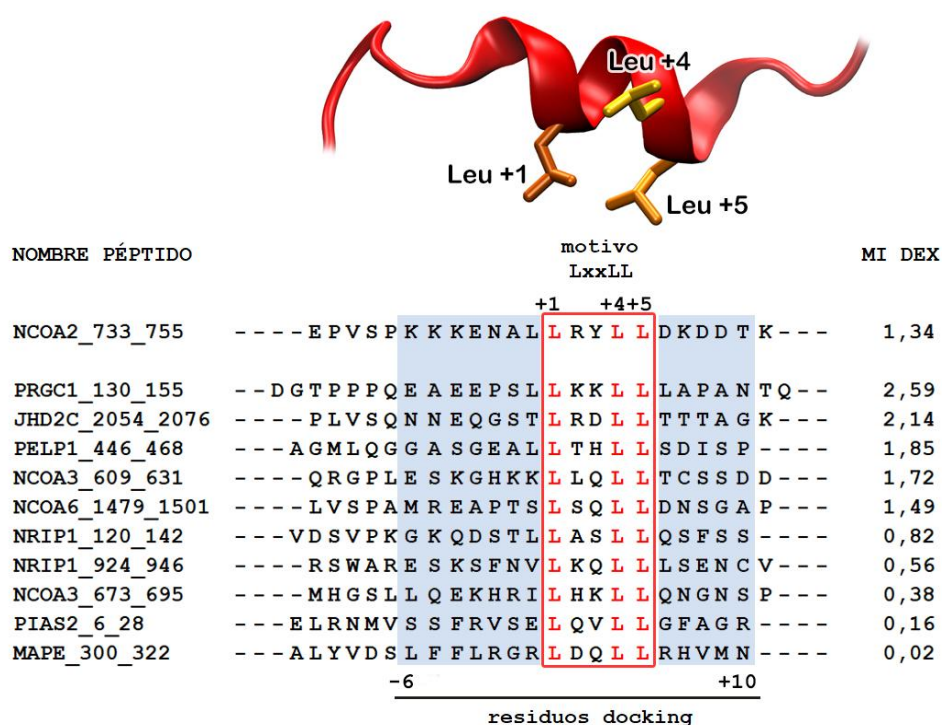


Figura 3.12. Correguladores con sus secuencias aminoacídicas alineadas según el motivo LxxLL y la energía de interacción obtenida por el arreglo MARCoNI.

Luego, con el objetivo de analizar una posible correlación entre la energía de interacción determinada por *docking* y los resultados obtenidos por MARCoNI para los 11 péptidos seleccionados, construimos los gráficos que se muestran en la **Figura 3.13**. Buscamos así determinar si la energía de interacción del estado final del complejo GR LBD/Dex-péptido obtenida en el *docking* tiene la habilidad de predecir la afinidad determinada para cada péptido, estimada esta como el MI_{Dex} (**Figura 3.13 a**), como el Log Binding_{Dex} (**Figura 3.13 b**) o como el Log de la diferencia entre el Binding_{Dex} y $\text{Binding}_{Vehículo}$ (**Figura 3.13 c**). Este análisis revela que en los tres casos el método de *docking* resulta capaz de discriminar entre aquellos péptidos con valores extremos de la medida analizada, aunque para los péptidos con valores intermedios se obtienen valores de energía similares. Los valores que proporcionan una mejor correlación son los del MI_{Dex} , con un valor de $R^2 = 0.75$. Sin embargo, un análisis pormenorizado muestra que para los péptidos con MI_{Dex} intermedio ($0.5 < MI < 2.0$) se obtienen valores de energía muy similares, con lo cual el método de *docking* resulta incapaz de predecir la afinidad relativa de esos péptidos por el complejo GR LBD/Dex.

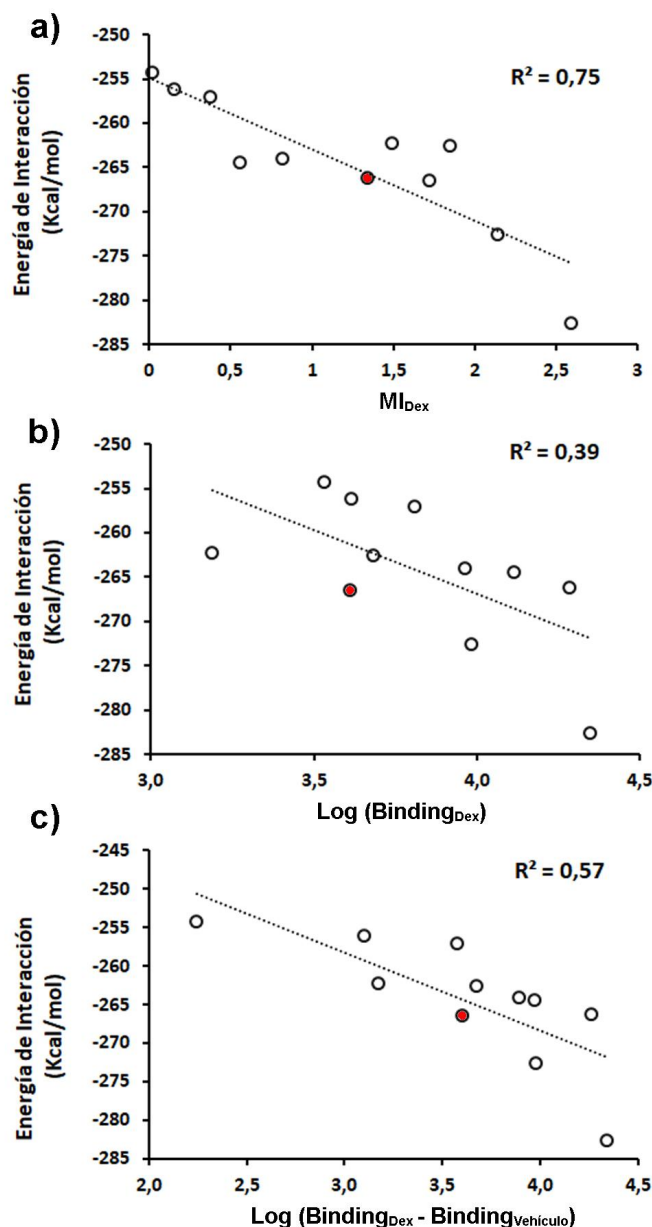


Figura 3.13. Correlación entre la energía de interacción obtenida por *docking* entre GR LBD-Dex y los fragmentos de 17 aminoácidos de 11 péptidos correguladores y los valores obtenidos con el ensayo MARCoNI. En rojo se indica el péptido correspondiente al tercer motivo LxxLL de NCoA-2, cocrystalizado con el GR LBD en el PDB ID: 1m2z y usado como estructura inicial para el *docking*.

En base a estos resultados, decidimos extender el análisis a todos los péptidos del microarreglo, en busca de analizar si el método de *docking* tiene la capacidad de predecir en forma global la tendencia de los valores de MI_{Dex} . Fueron excluidos los

péptidos que no presentan el motivo LxxLL y aquellos con flancos a la caja NR truncos y, por tanto, sin los 17 aminoácidos necesarios para la simulación. En total, se simularon 94 péptidos en las mismas condiciones que los 11 anteriormente seleccionados. La **Figura 3.14** muestra que, cuando se consideran los 94 péptidos, no se observa ninguna correlación entre la energía de interacción calculada y el MI_{Dex} medido experimentalmente. Incluso no resulta posible distinguir una energía de interacción mayor para los péptidos del grupo A anteriormente definido (aquellos que poseen un MI_{Dex} significativamente mayor a 1, en rojo en la **Figura 3.14**) que para el resto de los péptidos. Teniendo en cuenta estos resultados negativos, se ensayaron dos estrategias adicionales diferentes a fin de mejorar la predicción de la energía de interacción calculada por *docking*: por un lado, el aumento del número de poses obtenidas a 2500, y por el otro, la realización del *docking* con restricciones a fin de restringir la movilidad del péptido sobre el GR LBD. Sin embargo, tampoco se logró obtener de esta manera resultados que correlacionen con las medidas experimentales.

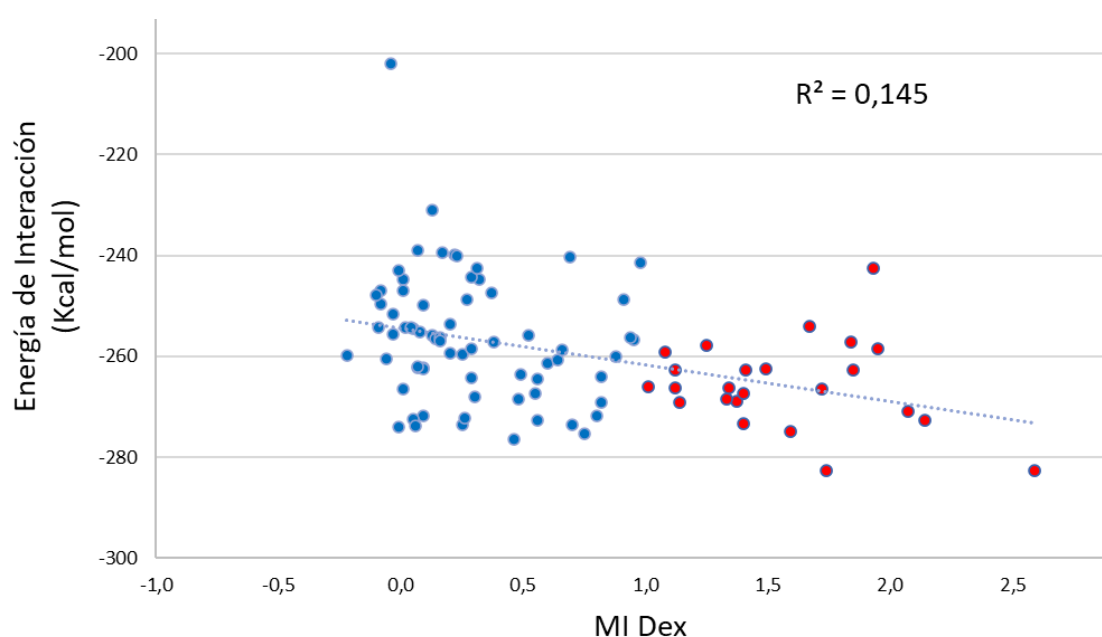


Figura 3.14. Correlación entre la energía de interacción entre GR LBD-Dex y 94 péptidos pertenecientes a correguladores obtenida por *docking* (ordenadas) y por MARCoNI (abscisas). En rojo se indican 24 de los 27 puntos correspondientes al grupo A del punto 3.6 (los 3 restantes tienen menos de 17 aminoácidos y no fueron simulados).

Finalmente, teniendo en cuenta el logo obtenido para el grupo A, y considerando que el molde inicial para el *docking* posee una leucina en posición 0, decidimos acotar el análisis de la correlación solamente para aquellos péptidos que poseen una leucina en dicha posición. Esto está fundamentado en la hipótesis de que estos péptidos deberían conservar una estructura más parecida a la inicial usada en el *docking*, de manera que la conformación final y su energía pudiera estimarse con una mayor confianza. De esta manera seleccionamos 16 péptidos para el análisis, aunque 3 de ellos con un valor de $\text{Binding}_{\text{Vehículo}}$ menor a 100 fueron descartados por considerar que estos bajos valores podrían afectar fuertemente los valores de MI. La **Figura 3.15** muestra una correlación aceptable entre la energía calculada y el MI_{Dex} .

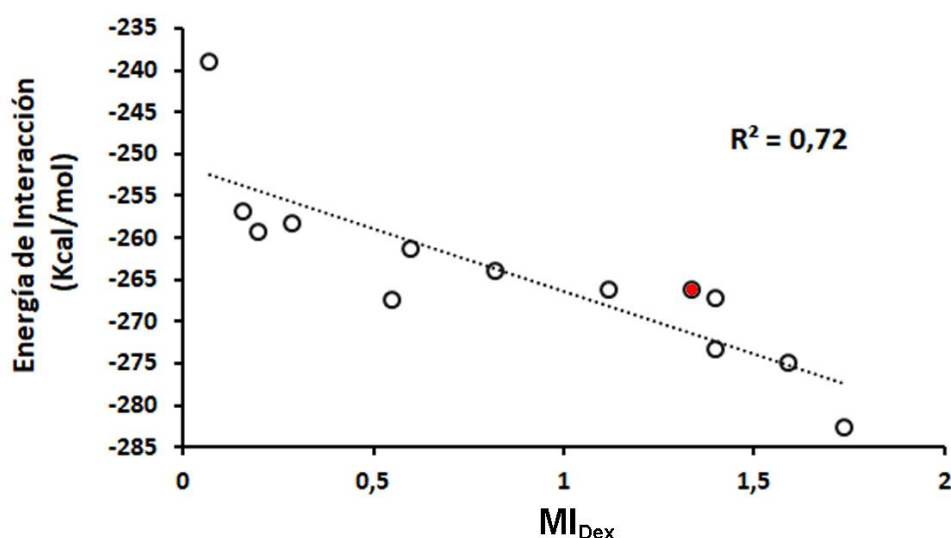


Figura 3.15. Correlación entre la energía de interacción entre GR LBD-Dex y 13 péptidos que poseen una leucina en posición 0 del logo obtenido previamente. En rojo se indica el péptido correspondiente al tercer motivo LxxLL de NCoA-2, cocrystalizado con el GR LBD en el PDB ID: 1m2z y usado como estructura inicial para el *docking*.

3.8. Conclusión

El estudio de la interacción entre el GR y los correguladores se ha abordado a través de distintos métodos. En esta Tesis hemos analizado la información obtenida a través de un sistema de microarreglo de péptidos, en busca de evaluar cómo la secuencia de la caja NR determina la unión al GR LBD en presencia de distintos ligandos. A pesar de encontrar variaciones considerables en los valores de unión medidos, posiblemente originados en la unión inespecífica de los péptidos al GR LBD, a través, por ejemplo, del contacto con regiones diferentes al dominio AF-2, al calcular el MI observamos una buena respuesta global del método, con capacidad de discernir entre perfiles de reclutamiento de péptidos de ligandos agonistas y antagonistas. Además, a partir del análisis de las secuencias y obtención del logo correspondiente pudimos extraer conclusiones relevantes sobre el papel de ciertos residuos en las distintas posiciones y su interacción con residuos específicos del receptor.

Luego aplicamos un método de *docking* proteína-péptido, logrando determinar la energía de interacción entre cada péptido y el complejo GR LBD/Dex. Si bien inicialmente logramos obtener cierta correlación entre el MI medido y la energía calculada para los casos extremos del grupo de muestra seleccionado, al incluir todos los péptidos con motivo LxxLL no se observó que los péptidos con mayor MI posean una energía de interacción más favorable. Creemos que diversos factores podrían explicar esta falta de correlación. Por un lado, debería considerarse un posible papel de los extremos N- y C-terminal de los péptidos, tanto en la determinación en el microarreglo de péptidos como en el método de *docking*. Por ejemplo, un análisis minucioso de las secuencias de los péptidos del microarreglo reveló que dos fragmentos de la misma caja de NR del mismo corregulador (PRGC1_130_155 y PRGC1_134_154), difieren solo en su longitud (5 aminoácidos), y sin embargo los valores de MI_{Dex} varían significativamente (**Figura 3.16**). Así, estos extremos están influyendo de algún modo en el valor de la afinidad medida de forma experimental, probablemente a través de interacciones no específicas. De cualquier manera, al tomar fragmentos de 17 aminoácidos para realizar el estudio por *docking*, se están evaluando dos secuencias

idénticas a las que luego se le asignan valores de MI diferentes. Esto inevitablemente impacta de forma negativa en la correlación entre la afinidad y la energía calculada.

Péptido	secuencia																		MI Dex
PRGC1_130_155	-	-	D	G	T	P	P	P	Q	E	A	E	E	P	S	L	L	K	2,59
PRGC1_134_154	-	-	-	-	-	-	P	P	Q	E	A	E	E	P	S	L	L	K	1,74

Figura 3.16. Comparación entre PRGC1_130_155 y PRGC1_134_154. Se indican los aminoácidos utilizados para *docking*, con el motivo LxxLL en letras rojas, y el MI Dex de cada péptido.

Por otro lado, el método de *docking* péptido-proteína presenta sus propios desafíos. Primero, los péptidos en general contienen numerosos enlaces rotables a considerar en la búsqueda conformacional que demandan altos esfuerzos computacionales para modelar las interacciones con precisión. En segundo lugar, ligeros cambios en las secuencias peptídicas pueden dar lugar a importantes reordenamientos del esqueleto del péptido. Finalmente, este método, al considerar al GR LBD de forma rígida, no considera que la estructura del receptor puede diferir entre varias conformaciones, lo que dificulta el modelado y la puntuación de la estructura nativa correctamente (Raveh, London and Schueler-Furman, 2010). Es decir, FlexPepDock no tiene la capacidad de considerar los efectos alostéricos que los corre reguladores puedan inducir sobre el dominio AF-2 y la H12 en particular.

A pesar de estas consideraciones, sin embargo, resulta prometedor que al restringir el análisis únicamente a los péptidos más similares al usado como molde para la simulación, es decir aquellos con una leucina en posición cero, se obtenga una correlación aceptable entre el MI y la energía de interacción calculada. Esto indicaría que para los complejos más similares al original, donde no se han de esperar modificaciones estructurales importantes más allá de la rotación de las cadenas laterales, el método de *docking* sí tiene la habilidad de predecir la tendencia de MI observada.

CAPÍTULO 4.

INTERACCIÓN GR-PR

CAPÍTULO 4.

INTERACCIÓN GR-PR

Antecedentes

Como se describió en la introducción, los SRs comparten secuencias y arquitectura conservadas, dispuestas en tres dominios principales: un dominio N-terminal intrínsecamente desordenado, el DBD muy conservado y el LBD también con alto grado de conservación. Luego de su activación por ligando, los SR translocan al núcleo, dimerizan y se unen al ADN en secuencias específicas denominadas elementos de respuesta hormonal (*Hormone Response Element*, HRE). Estos últimos eventos no están necesariamente enumerados de manera secuencial, ya que aún restan dilucidar los mecanismos moleculares, actores implicados y el orden y ubicación precisa en que ocurren.

4.1. Interacción entre el GR y otros SRs

GR, MR y PR comparten varias características estructurales y funcionales, como el reconocimiento de secuencias específicas presentes en el ADN de sus genes blanco por medio del DBD (Lieberman *et al.*, 1993; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Evans, 2005). En ausencia de ligando, estos receptores se asocian a chaperonas formando complejos muy similares (Pratt and Toft, 1997), mientras que en respuesta a la unión de ligandos al LBD, interaccionan con una población común de corre reguladores (Westin, Rosenfeld and Glass, 1999). A pesar de estas semejanzas, la respuesta biológica resultante de la activación de cada uno resulta llamativamente diferente. En suma, teniendo en cuenta que los SRs se coexpresan y coactivan en numerosos tipos celulares, la comprensión cabal de sus actividades moleculares requiere un estudio pormenorizado de los mecanismos de interacción cruzada, o *crosstalk*, entre ellos.

En relación al par GR/MR, ya desde la década de 1990 se conoce que estos receptores pueden interactuar funcionalmente a nivel transcripcional en células CV-1b y, además,

que se contactan físicamente a través de la formación de heterodímeros en un HRE compartido *in vitro* (Liu *et al.*, 1995). Savory *et al.* sugirieron que la interacción GR-MR ocurría en el citoplasma y que dependía únicamente del LBD (Savory *et al.*, 2001). Sin embargo, más adelante se demostró por FRET que la heterodimerización entre GR y MR fluorescentes se observa a nivel nuclear en cultivos de neuronas de hipocampo y en células Cos-1 (Nishi *et al.*, 2004). Por otro lado, se describió que la heterodimerización GR-MR tiene una respuesta inhibitoria en la represión del gen que expresa el receptor neuronal de serotonina 5-HT1A (Ou *et al.*, 2001).

Más recientemente, ChIP secuenciales y en tándem mostraron que, tras el estrés por natación forzada, GR y MR se unen como homo- y/o heterodímeros a los sitios HRE dentro de algunos genes como *Fkbp5* y *Per1*, pero no del gen *Sgk1* (Mifsud and Reul, 2016). También empleando ChIP, en un modelo celular renal humano se encontró que ambos receptores interactúan dinámica y cíclicamente como homodímeros o heterodímeros en el mismo promotor del gen *Per1* (Le Billan *et al.*, 2018). En las células mamarias 3617 de ratón, el GR y MR interactúan en el núcleo y en un sitio de unión al ADN asociado a la cromatina *in vivo*, formando complejos de orden superior a los heterodímeros (Pooley *et al.*, 2020). Finalmente, se observó que el MR endógeno influye en la cinética y la unión diferencial del GR al ADN, afectando el curso temporal, la especificidad y la magnitud de las respuestas transcripcionales de los GC (Carceller-Zazo *et al.*, 2023). El conjunto de estos estudios demuestra que la interacción de MR y GR en los sitios HRE constituye un nivel adicional de complejidad en la acción de los glucocorticoides.

La evidencia sobre la interacción GR-PR es mucho menos abundante, quizás debido a la limitada cantidad de tipos celulares que expresan simultáneamente ambos receptores, y a la mayor complejidad de un sistema en el cual los receptores son activados por ligandos selectivos, en lugar de ser activados por el mismo ligando como en el caso GR/MR. Así, no solo es necesario evaluar la respuesta cuando los dos receptores están activados, sino también cuando se activa sólo uno de ellos en presencia del otro inactivo. Hasta recientemente, sólo se habían publicado unos pocos artículos investigando las respuestas del GR y el PR en el mismo sistema (Nordeen *et al.*,

1989; Archer *et al.*, 1994; Shao *et al.*, 2006). Más aún, se sugirió que el PR no necesitaría ser transcripcionalmente activo para inhibir al GR y que dicha inhibición ocurriría en la etapa inicial de remodelado de la cromatina en los sitios de interacción GR/HRE (Archer *et al.*, 1994). El análisis en la línea celular T47D/A1-2, que expresa cantidades similares de ambos receptores, también reveló que los dos ligandos selectivos de cada uno de ellos (Dex y R5020, para el GR y el PR, respectivamente) regulan la expresión de forma diferente de un conjunto de genes que se solapan, pero que también son distintos (Wan and Nordeen, 2002). En la línea celular de cáncer de mama ER⁻, PR⁻, HER2⁻ y GR⁺ MDA-MB-231, la transfección con PR ha demostrado que corticosterona, el glucocorticoide endógeno, induce cambios morfológicos similares a los de progesterona (Leo *et al.*, 2004). Esto sugiere que los glucocorticoides pueden regular la morfología celular a través de la vía regulada por PR. Por otro lado, poca información se dispone sobre el efecto de altos niveles de progesterona u otros progestágenos en la actividad del GR en modelos celulares de cáncer de mama (Hegde *et al.*, 2016).

Recientemente, el análisis de la interacción funcional PR/GR llevada a cabo en nuestro grupo de trabajo arrojó resultados novedosos (Ogara *et al.*, 2019). Por un lado, se observó que el GR solo o activado con Dex exhibe un efecto modulador sobre funciones propias del PR, inhibiendo la desdiferenciación y la proliferación celular a través de la modulación de la expresión de ciertos genes blanco de PR en células tumorales epiteliales mamarias humanas. Por otro lado, tras la activación con Dex y R5020, tanto GR como PR co-inmunoprecipitan de extractos nucleares, lo que sugiere que ambos receptores son parte del mismo complejo proteico. Además, las células transfectadas con vectores de expresión pEGFP-hPR (Diep *et al.*, 2013) y pCherry-mGR (Presman *et al.*, 2014) y tratadas con ambas hormonas simultáneamente mostraron un brillo cruzado medio positivo y significativamente mayor. Este parámetro, determinado a partir de experimentos de correlación cruzada de fluctuación de fluorescencia (Digman *et al.*, 2009), indica que ambos receptores pueden ser parte del mismo complejo en células mamarias vivas (Ogara *et al.*, 2019); Marini, Tesis Doctoral, 2021). Por último, mediante análisis ChIP-seq y ChIP secuencial, se detectó la unión

superpuesta de GR y PR en determinados sitios, confirmando el reclutamiento conjunto de ambos receptores en sitios del genoma compartidos.

En este contexto, uno de los objetivos específicos propuestos para esta Tesis fue el de profundizar el análisis sobre la posible interacción GR/PR, en particular investigando a nivel funcional y estructural cómo la acción conjunta de estos receptores afectan la actividad transcripcional. Teniendo en cuenta que las regiones de ADN genómico estudiadas previamente (Ogara *et al.*, 2019) podrían contener más de un elemento HRE, sitios de unión inespecífica o sitios de unión no canónicos, y dado que el límite de resolución de las técnicas anteriores no permite establecer si los dos receptores están interactuando de manera directa o indirecta sobre la misma secuencia, nos propusimos evaluar la posible interacción entre GR y PR sobre una única secuencia HRE. Para ello se llevaron a cabo ensayos de transfecciones transitorias de un gen reportero bajo el control de las secuencias AGAACaccTGTTCT o AGAACagttTGTTCT (**Tabla 4.1**). Además, se emplearon abordajes biofísicos utilizando microscopía de fluorescencia de alta resolución en células vivas con el fin de analizar el estado de oligomerización de GR en presencia de PR y la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo proteico. Un análisis estructural *in silico* combinando simulaciones por dinámica molecular fue planteado también en busca de modelar posibles heterodímeros GR DBD-PR DBD sobre el HRE, evaluar la estabilidad de dicho complejo y caracterizar su comportamiento dinámico.

Resultados

4.2 Actividad Transcripcional

Para iniciar el estudio de la influencia de PR sobre la actividad del GR, decidimos utilizar las células epiteliales mamarias humanas T47D/A1-2. Esta línea celular es un clon derivado de T47D-WT que expresa de forma estable PR, GR y el gen reportero MMTV-LUC, el cual contiene dos secuencias HRE completas y 2 hemisitios HRE (**Tabla 4.1**) (Nordeen *et al.*, 1989; Archer *et al.*, 1994; Lambert and Nordeen, 2003). Estudios previos en esta línea celular habían demostrado, por un lado, que el MMTV-Luc integrado a la cromatina era refractario a la inducción por progestágenos dependiente de PR ((Nordeen *et al.*, 1989; Archer *et al.*, 1994; Lambert and Nordeen, 2003)); por otro, que luego de la estimulación conjunta con R5020 10^{-8} M y Dex 10^{-7} M se observaba una inhibición en la actividad transcripcional de GR de hasta un 80%. Como primer paso en nuestro estudio, entonces, realizamos una curva dosis respuesta estimulando con diferentes concentraciones de Dex, en presencia o ausencia de R5020 10^{-8} M. Nuestros resultados indican que la activación de PR afecta la eficacia de Dex, aunque no su potencia, revelando una interferencia funcional directa del PR sobre la expresión de MMTV-LUC dependiente de GR (**Figura 4.1**). Por otro lado, la estimulación solo con R5020 10^{-8} M produjo una inducción de la expresión del MMTV mucho menor que Dex en cualquiera de sus concentraciones (5.5 veces de inducción o 0.47% del máximo obtenido con Dex 3×10^{-8} M (1370 veces de inducción)).

Reportero	Número de HREs	Secuencia				
MMTV-HRE-Luc	2 (+2 hemisitios)	GTT	ACA	aac	TGT	TCT
TAT4-HRE-Luc	4	TGT		gga		
TK-HRE-Luc	2	AGA		tca		
FKBP5-HRE-Luc	1			ccc		
2c7a-HRE-Luc	1			gtt		
Consenso		AGA	ACA	xxx	TGT	TCT

Tabla 4.1. Construcciones reporteras utilizadas.

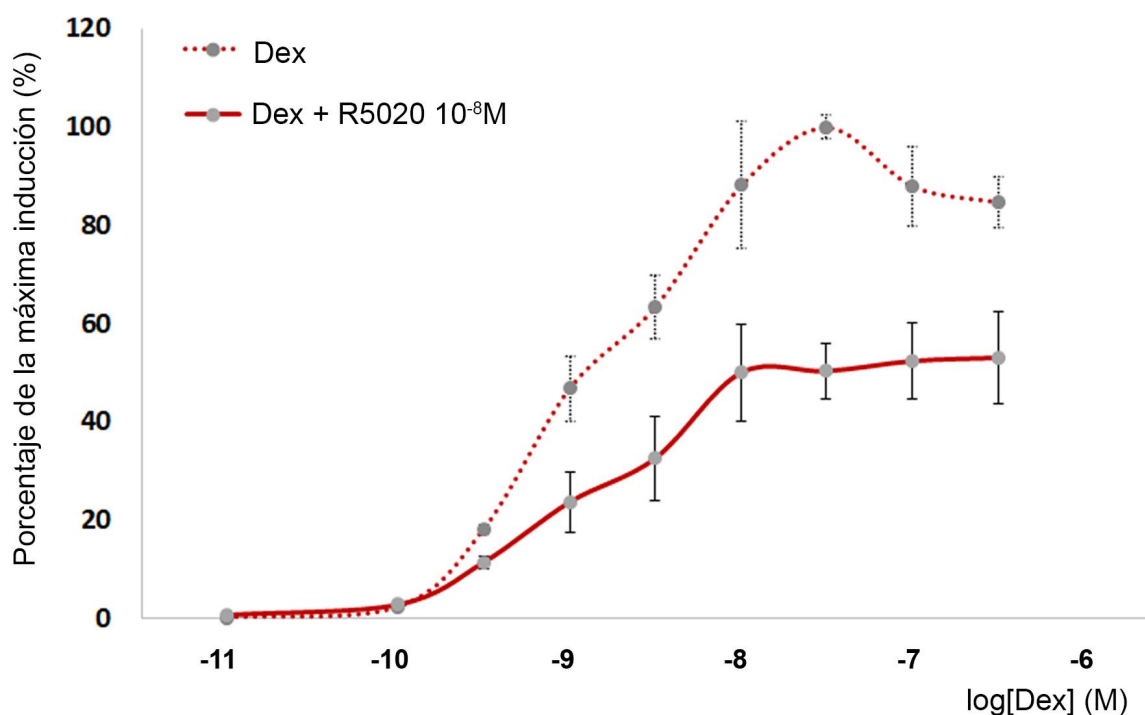


Figura 4.1. Células T47D-A1/2. Estimulación en presencia y ausencia de R5020 10^{-8} M en función de concentraciones crecientes de Dex. Se muestra el porcentaje de inducción (promedio $\pm$ desvío estándar), tomando como 100% la máxima inducción obtenida con Dex 3×10^{-8} M (1370 veces de inducción). Se muestra el promedio de dos experimentos independientes hechos por duplicado.

Con el propósito de analizar el comportamiento del par GR-PR en otros promotores conteniendo diferente número y secuencia de sitios HRE (TAT4-HRE-Luc y TK2-HRE-Luc, **Tabla 4.1**) se cotransfectaron células HEK-293T (que no expresan PR ni GR) con los vectores de expresión pFlag-hGR α y pEGFP-hPRb, que codifican para GR y PR humanos, respectivamente. Ambos receptores se expresan bajo el mismo promotor constitutivo CMV, y se transfectaron en la relación molar GR-PR 1:2 descrita para las células T47D A1/2 (Thackray, Lieberman and Nordeen, 1998), con valores finales de $0.025 \mu\text{g}/10^5$ células para PR, $0.0125 \mu\text{g}/10^5$ células para GR y $0.125 \mu\text{g}/10^5$ células para los genes reporteros. Luego, se determinó la actividad transcripcional al estimular con R5020 10^{-8} M, Dex 10^{-8} M o ambos agonistas a la vez. Al evaluar la actividad transcripcional sobre el MMTV en estas condiciones, se observó un comportamiento similar al observado previamente en las células T47D/A1-2. La inducción producida por Dex es

significativamente mayor que la producida por R5020, mientras que en presencia del ligando de PR la expresión de luciferasa dependiente de Dex es significativamente menor y similares a los obtenidos con R5020 solo. En el caso del reportero TAT4-HRE-Luc se observó un perfil muy similar al obtenido con MMTV, aunque con mayor inducción relativa en respuesta a R5020 (solo y con Dex). Por otro lado, aunque la expresión de luciferasa bajo el control de TK2-HRE resultó ser mayor en respuesta a R5020 que la obtenida con Dex, el co-tratamiento también provoca una menor actividad transcripcional respecto al tratamiento con cada uno de los agonistas por separado (**Figura 4.2**).

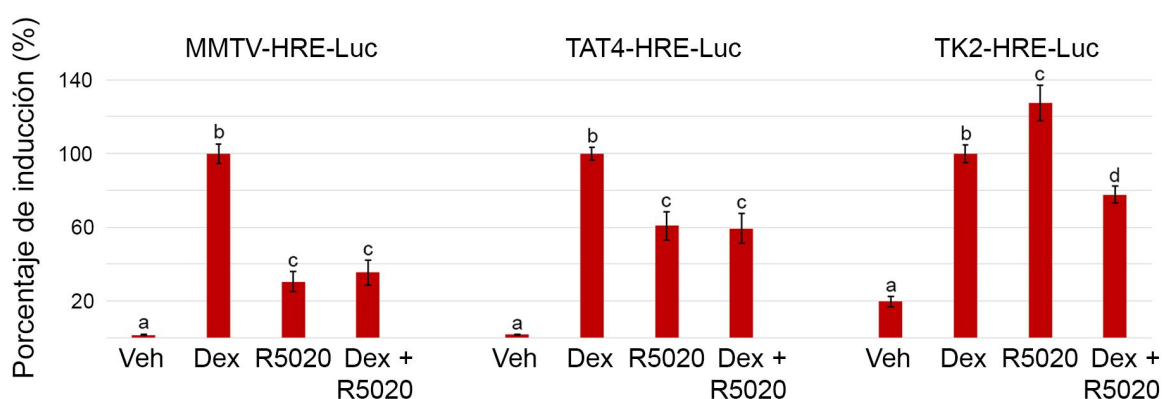


Figura 4.2. Actividad Luciferasa expresada como porcentaje de la inducción con Dex 10^{-8} M (promedio $\pm$ desvío estándar). Células HEK-293T transfectadas con pFlag-hGR α ($0.0125\mu\text{g}/10^5$ células), pEGFP-hPRb ($0.025\mu\text{g}/10^5$ células) y un gen reportero HRE-Luc ($0.125\mu\text{g}/10^5$ células), estimuladas con Dex 10^{-8} M, R5020 10^{-8} M o Dex 10^{-8} M + R5020 10^{-8} M (n=3). La significancia estadística se determinó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P<0.05$) para cada condición.

Para acotar nuestro estudio a un solo sitio HRE, diseñamos dos constructos, Fkbp5-HRE-Luc y 2c7a-HRE-Luc (**Tabla 4.1**), a partir de secuencias de fragmentos de ADN que fueron utilizados para cristalizar el homodímero GR DBD (PDB ID:3g6p) y el homodímero PR DBD (PDB ID: 2c7a), respectivamente. Inicialmente, determinamos los niveles de inducción de la expresión de estos reporteros usando cuatro diferentes

concentraciones del vector de expresión de GR en la transfección (entre $0.075\mu\text{g}/10^5$ células y $0.0075\mu\text{g}/10^5$ células), a fin de determinar el orden de concentración a utilizar para realizar los ensayos de interferencia con el PR. En el caso de Fkbp5-HRE-Luc, observamos una baja respuesta aun con las mayores concentraciones de GR usadas, rondando solamente las 6 a 8 veces de inducción (**Fig. 4.3 a**). En cambio, la respuesta obtenida con el reportero 2c7a-HRE-Luc resultó ser más alta, superando incluso las 25 veces de inducción a la mayor concentración de receptor ensayada (**Fig. 4.3 b**). Además, se observa la tendencia de que a medida que la cantidad de GR disminuye, también lo hace la respuesta. Dado que nuestro objetivo final consiste en evaluar cómo la presencia del PR afecta la actividad transcripcional del GR, consideramos que la baja respuesta obtenida con Fkbp5-HRE-LUC no resultaría suficiente para lograr discernir el efecto esperado. Por lo tanto, a partir de aquí continuamos trabajando únicamente con el reportero 2c7a-HRE-Luc, seleccionando la concentración $0.125\mu\text{g}/10^5$ células para los posteriores ensayos de interferencia.

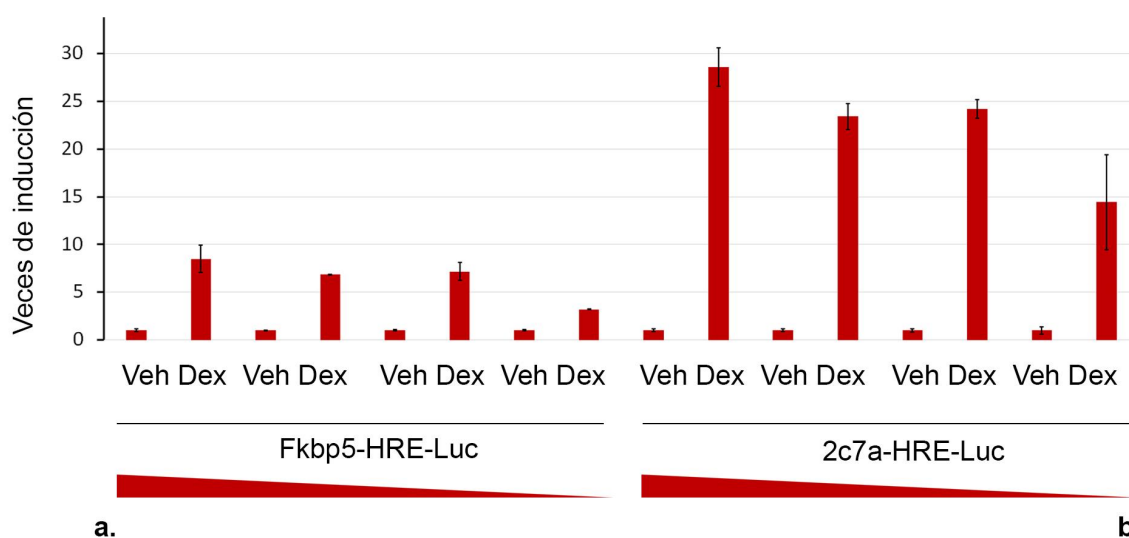


Figura 4.3. Actividad Luciferasa expresada como veces de inducción respecto al control (células no tratadas) (promedio $\pm$ desvío estándar). Células HEK-293T transfectadas con pFlag-hGR α en un rango de cantidades entre 0.075 y $0.0075 \mu\text{g}/10^5$ células (cantidades decrecientes indicadas con triángulos rojos inferiores) conjuntamente con $0.125\mu\text{g}/10^5$ células de los genes reporteros pFkbp5-HRE-Luc (**a**) o p2c7a-HRE-Luc (**b**), estimuladas con Dex 10^{-8}M . Se muestra el promedio de dos experimentos independientes hechos por duplicado.

A continuación se co-transfectaron los vectores pFlag-hGR α (0.0125 μ g/10⁵ células) y pEGFP-hPRb (0.025 μ g/10⁵ células) junto con el gen reportero en las células HEK-293T que luego fueron tratadas con ambos ligandos, juntos o separados. Con la cantidad de PR ensayada, observamos una menor actividad transcripcional del GR (**Figura 4.4**, flecha azul) que la obtenida transfectando GR solo (**Figura 4.4**, flecha roja), no dependiente de la presencia del ligando R5020. Aunque este resultado no mostró estrictamente una diferencia significativa, la co-expresión del PR podría afectar los valores de inducción observados con Dex cuando se transfecta el GR solo. Así, a esta alta cantidad de PR, el PR sin ligando podría interferir, de alguna manera, sobre la capacidad del GR de inducir la expresión de este gen reportero (**Figura 4.4**).

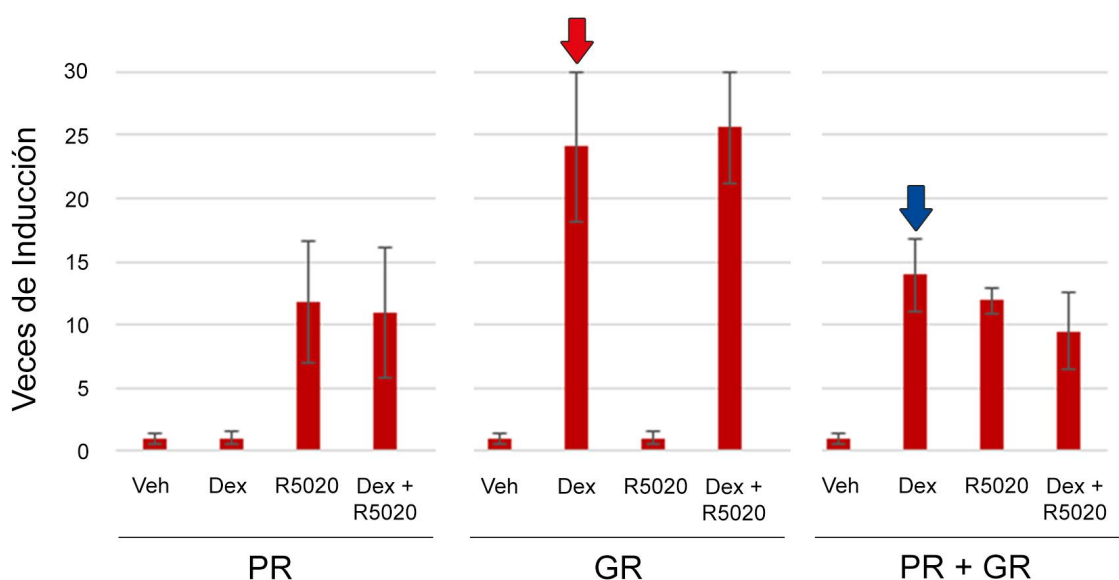


Figura 4.4. Actividad Luciferasa expresada como veces de inducción respecto del control (promedio $\pm$ desvío estándar). HEK-293T transfectadas con p2c7a-HRE-Luc (0.125 μ g/10⁵ células), pFlag-hGR α (0.0125 μ g/10⁵ células) y pEGFP-hPRb (0.025 μ g/10⁵ células), estimuladas con R5020 10⁻⁸M y/o Dex 10⁻⁸M (n=3).

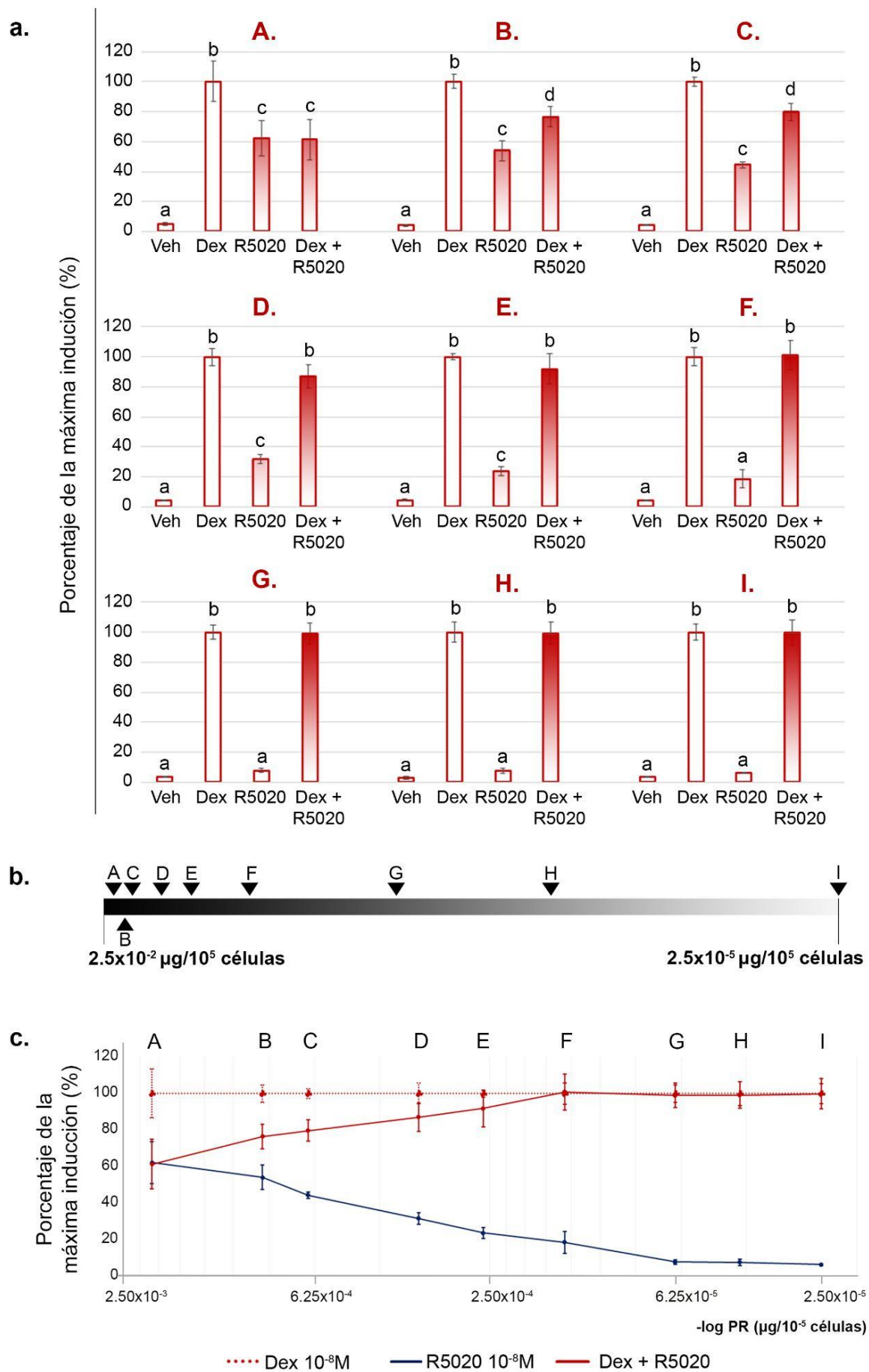
En vista de este resultado, decidimos repetir el ensayo con menores cantidades del vector de expresión del PR (siempre manteniendo fija la cantidad de GR). Observamos que al disminuir la cantidad de PR transfectado, es decir la relación relativa de expresión entre ambos receptores, el efecto *per se* de la presencia de PR descripto anteriormente no se detecta. Sin embargo, en estas condiciones sí se observa una

menor inducción de la expresión del reportero dependiente de Dex cuando el PR es activado con R5020. Para caracterizar mejor este efecto se realizaron ensayos transfectando cantidades decrecientes de PR (generadas mediante diluciones seriadas a partir de $0.025\mu\text{g}/10^5$ células) (**Figura 4.5**). Notablemente, se observó que a medida que la cantidad de PR transfectada disminuye, la interferencia en la actividad del GR también lo hace. A la cantidad de PR de $3.13 \times 10^{-4} \mu\text{g}/10^5$ células (**Figura 4.5.a.D**), sin embargo, aunque la actividad producida por R5020 es todavía detectable, ya no se observa inhibición de la expresión del gen reportero dependiente de Dex en el co-tratamiento de ambos receptores.

Estos resultados se pueden visualizar más claramente graficando la curva de interferencia que ejercen cantidades crecientes de PR activado con R5020 sobre la inducción de la expresión del gen reportero dependiente de Dex (**Figura 4.5.c**).

En conclusión, el conjunto de estos resultados evidencia una interferencia transcripcional *in vitro* dependiente de ligando que ejerce la presencia de PR sobre la actividad del GR, tanto en promotores con varios HREs como con un único HRE.

Figura 4.5 (página siguiente). **a.** Interferencia dependiente de ligando. Actividad Luciferasa expresada como porcentaje de la inducción con Dex 10^{-8}M (promedio $\pm$ desvío estándar). Células HEK-293T transfectadas con p2c7a-HRE-Luc ($0.125\mu\text{g}/10^5$ células), la concentración mínima activa de pFlag-hGR α ($0.0125\mu\text{g}/10^5$ células) y concentraciones decrecientes de pEGFP-hPRb, estimuladas con Dex 10^{-8}M , R5020 10^{-8}M o R5020 10^{-8}M + Dex 10^{-8}M ($n=3$). La significancia estadística se determinó utilizando mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P<0.05$) para cada condición. **b.** Representación esquemática de las diluciones del plásmido pEGFP-hPRb utilizadas, desde 2.5×10^{-2} hasta $2.5 \times 10^{-5} \mu\text{g}/10^5$ células. Las letras corresponden a las condiciones graficadas en **a**. **c.** Diagrama de dispersión de los resultados expuestos en **a** expresados como porcentaje de la inducción con Dex 10^{-8}M (promedio $\pm$ desvío estándar) para cada cantidad de pEGFP-hPRb transfectada y expresado como $-\log \text{PR}$ ($\mu\text{g}/10^5$ células). Las líneas agrupan los puntos de los respectivos tratamientos: Dex 10^{-8}M (línea punteada roja), R5020 10^{-8}M (línea continua azul) o R5020 10^{-8}M + Dex 10^{-8}M (línea continua roja). Las letras indican la condición correspondiente al punto **a**.



4.3 Estado de oligomerización y capacidad de GR y PR de formar parte de un mismo complejo

El estudio de procesos moleculares dinámicos *in vivo* ha sido por mucho tiempo un gran desafío, limitado por las condiciones técnicas disponibles. El desarrollo de la microscopía confocal y de las técnicas basadas en el análisis de fluctuaciones de fluorescencia han sido de gran utilidad para su avance (Stortz *et al.*, 2017).

Dichos métodos se basan en la detección y el análisis de fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo, causadas por el movimiento de las moléculas fluorescentes. Para que estas fluctuaciones sean apreciables, se debe trabajar con bajas concentraciones de fluoróforos y volúmenes de observación pequeños, como es el caso del volumen confocal (del orden de los femtolitros).

Número y Brillo (*Number & Brightness*, N&B)

La técnica de Número y Brillo (*Number and Brightness*, N&B) es una técnica de microscopía de fluorescencia que permite calcular el *número* promedio de moléculas fluorescentes en movimiento en el volumen de observación, así como su *brillo* en cada píxel de una imagen (Digman *et al.*, 2008). El brillo molecular, o brillo real (ϵ), se define como el número de fotones emitidos por molécula por unidad de tiempo. En el caso más sencillo, el brillo de oligómeros formados por n monómeros es n veces el brillo de cada monómero. Por ejemplo: si una proteína contiene un solo fluoróforo, como es el caso de GFP-GR, esta molécula emitirá n fotones por unidad de tiempo. Si esa misma proteína se encuentra luego formando un dímero, el complejo contiene dos fluoróforos (uno por cada monómero) y emitirá $2n$ fotones por unidad de tiempo; en consecuencia, el brillo ϵ del dímero es el doble del brillo ϵ del monómero (**Figura 4.6**). Si la proteína formase un tetrámero, emitiría $4n$ fotones por unidad de tiempo, teniendo como resultado un brillo ϵ 4 veces superior al del monómero.



Figura 4.6. Representación esquemática de la relación de valor de brillo ϵ en diferentes estados de oligomerización de una proteína.

Por otro lado, la intensidad de fluorescencia que se detecta con un microscopio es proporcional al número de fluoróforos presentes en la célula. Sin embargo, un mismo valor de intensidad puede corresponder tanto a varias moléculas individuales (monómeros) como a pocas moléculas oligomerizadas. La técnica de N&B, como se describe más abajo, permite distinguir entre estas dos posibilidades (**Figura 4.7**) y, de este modo, calcular el estado de oligomerización de proteínas fluorescentes en una región celular específica.

Para discriminar el estado de oligomerización de una proteína fluorescente, entonces, es preciso calcular la *varianza* (σ^2) en los valores de intensidad de fluorescencia. En la **Figura 4.7** se ejemplifican 4 situaciones hipotéticas en las que se obtiene la misma intensidad de fluorescencia media ($\langle I \rangle$) (**Figura 4.7 a-d**, línea azul). Sin embargo, puede observarse que en el caso **b** se registran fluctuaciones en intensidad a lo largo del tiempo de mucha menor amplitud que en **c** y **d**. Esto se correlaciona directamente con la estequiometría de las moléculas que ingresan y egresan del volumen de observación. En efecto, el movimiento de proteínas monoméricas (**b**) registra “saltos” menores que aquel de los dímeros (**c**) o trímeros (**d**).

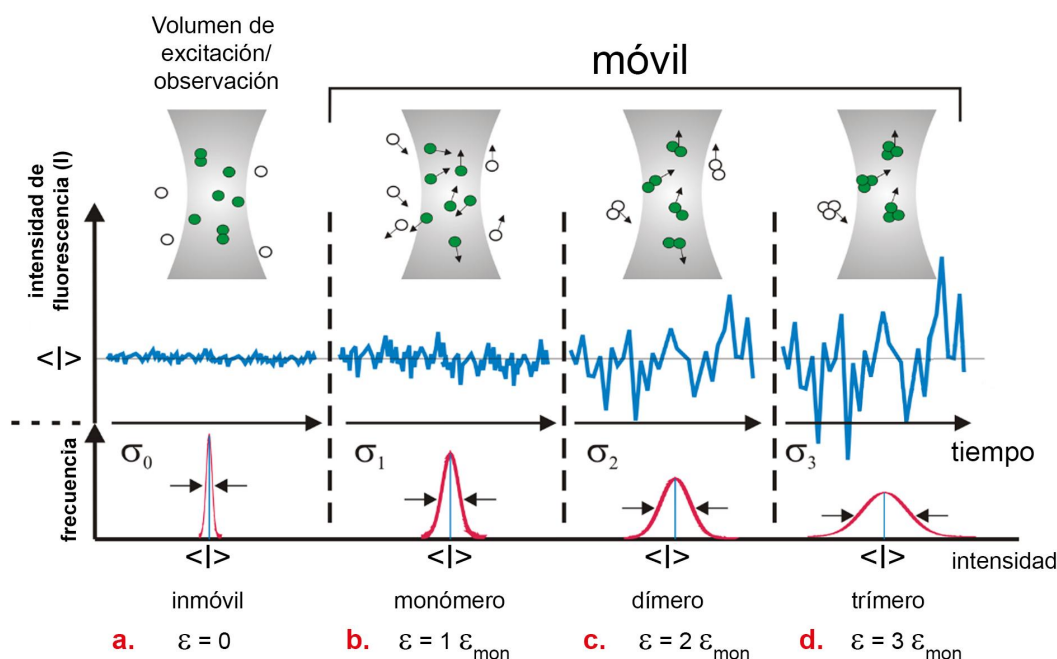


Figura 4.7. El brillo molecular (ϵ) puede estimarse analizando las fluctuaciones de intensidad de imagen a imagen en el volumen confocal ($\sim \text{fl}$). Las fluctuaciones se analizan midiendo la relación entre la varianza de la señal de intensidad (σ^2) y el valor medio de intensidad ($\langle I \rangle$). Cuando las moléculas fluorescentes están inmóviles, esta relación describe el ruido del detector, que sigue una distribución de Poisson ($\sigma^2 = \langle I \rangle$). Si la señal fluctúa debido a moléculas móviles, la relación $\sigma^2 / \langle I \rangle$ es directamente proporcional a la ϵ de la especie difusora. El esquema ilustra la desviación estándar para un número igual de fluoróforos organizados como monómeros inmóviles (σ_0), monómeros móviles (σ_1), dímeros (σ_2) o trímeros (σ_3). Adaptado de (Presman *et al.*, 2014).

Estas diferencias se evidencian matemáticamente calculando, como dijimos, la *varianza* (σ^2) en los valores de intensidad de fluorescencia, siendo mayor a mayor estado de oligomerización. Por lo tanto, el brillo aparente “B” en un dado píxel puede calcularse como el cociente entre la varianza (σ^2) y la intensidad promedio ($\langle I \rangle$) (Ecuación 1). Luego, se demuestra que el brillo real (ϵ) es igual a B-1 (Digman *et al.*, 2008) ecuación 2). En resumen, los valores de N y B se pueden calcular como se muestran las siguientes ecuaciones:

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle I \rangle} \quad \text{Ec. (1)} \quad B = \epsilon + 1 \quad \text{Ec. (2)} \quad N = \frac{\langle I \rangle^2}{\sigma^2} \quad \text{Ec. (3)}$$

Para continuar con el análisis de las interacciones *in vivo* de GR y PR, y en colaboración con el grupo del Dr. Presman (IFIByNE-UBA-CONICET), planteamos una serie de experimentos en células de adenocarcinoma mamario D4-GR-KO, desarrolladas para el estudio de la estructura cuaternaria de SRs, y ampliamente caracterizada para el GR en particular (Paakinaho *et al.*, 2019). Estas células poseen incorporado a su genoma aproximadamente 200 copias de un *cassette* génico conteniendo el gen reportero MMTV-ha-Ras (que denominamos *array* MMTV), no expresan PR, y se les ha eliminado por CRISPR-cas9 el gen de GR. Los detalles de esta línea celular se describen en la sección **6.2.4**. Mediante el *array* MMTV, es posible medir por N&B el estado de oligomerización de un SR cuando está mayormente unido a la cromatina, debido a que hay una gran concentración de sitios específicos de unión al receptor (Presman *et al.*, 2016).

Para los experimentos, se transfectaron transitoriamente células D4-GR-KO con los vectores de expresión que codifican cada uno de los receptores, fusionados a una proteína fluorescente (pEGFP-mGR) o a un marcador detectable por sonda fluorescente con emisión en otra longitud de onda (pHalo-hPRb y sonda JF549). Las células fueron sometidas a distintos tratamientos para luego analizar mediante N&B el estado de oligomerización del GR en presencia o ausencia del PR (**Tabla 4.2**). El cálculo de brillo se efectuó únicamente sobre pEGFP-mGR.

Condición		1	2	3	4
Receptor		EGFP-GR	EGFP-GR	EGFP-GR Halo-PRb	EGFP-GR Halo-PRb
Tratamiento		vehículo	Dex 10^{-8} M	Dex 10^{-8} M	Dex 10^{-8} M R5020 10^{-8} M
Número de células	nucleoplasma	36	17	25	28
	<i>array</i> MMTV	-	15	5	12

Tabla 4.2. Diseño experimental para el estudio de la interacción GR-PR mediante N&B.

Previamente, se estableció que las veces de aumento del brillo ϵ obtenido para pEGFP y para pEGFP-mGR sin ligando, eran similares (Presman *et al.*, 2014). Dado que pEGFP-mGR tiene una única molécula EGFP, se concluye que en estas condiciones GR se comporta como monómero y se le asignó un valor de brillo ϵ igual a 1. En nuestros experimentos, entonces, pEGFP-mGR tratado con vehículo se considera como *control monomérico* y se lo emplea como parámetro comparativo para las restantes determinaciones. En cada sesión de microscopía se determinó dicho control para descartar posibles diferencias en las mediciones causadas por el decaimiento de la intensidad del láser a lo largo del tiempo y se usó para analizar los resultados obtenidos en dicha sesión de trabajo.

Los resultados muestran que al transfectar con pEGFP-mGR y tratar con vehículo, el GR tiene una ubicación mayormente citoplasmática; a nivel nuclear, no se evidencian *foci* ni unión al *array* MMTV observables al microscopio (**Figura 4.8.a**), lo que se corresponde con el comportamiento descrito para el GR en ausencia de ligando (Presman *et al.*, 2014, 2016; Stortz *et al.*, 2017). Por el contrario, al estimular con Dex 10^{-8} M, la presencia de GR citoplasmático disminuye drásticamente, evidenciando su translocación y acumulación en el núcleo celular; se observan además numerosos *foci* nucleares característicos de este receptor y también es posible identificar el *array* de MMTV cerca de los nucleolos (**Figura 4.8.b**). En esta condición, el cálculo de brillo ϵ en el nucleoplasma mostró un aumento de aproximadamente dos veces respecto a pEGFP-mGR sin ligando, indicando la presencia de dímeros de GR (**Figura 4.9**) Por otro lado, en la misma figura se observa que el brillo ϵ calculado para GR unido a ADN, es decir, sobre el *array* MMTV, es de más de 4 veces el del monómero, lo cual sugiere un estado de oligomerización mayor, cercano a un tetrámero. Estos resultados del estado de oligomerización del GR coinciden con los anteriormente descritos (Presman *et al.*, 2016).

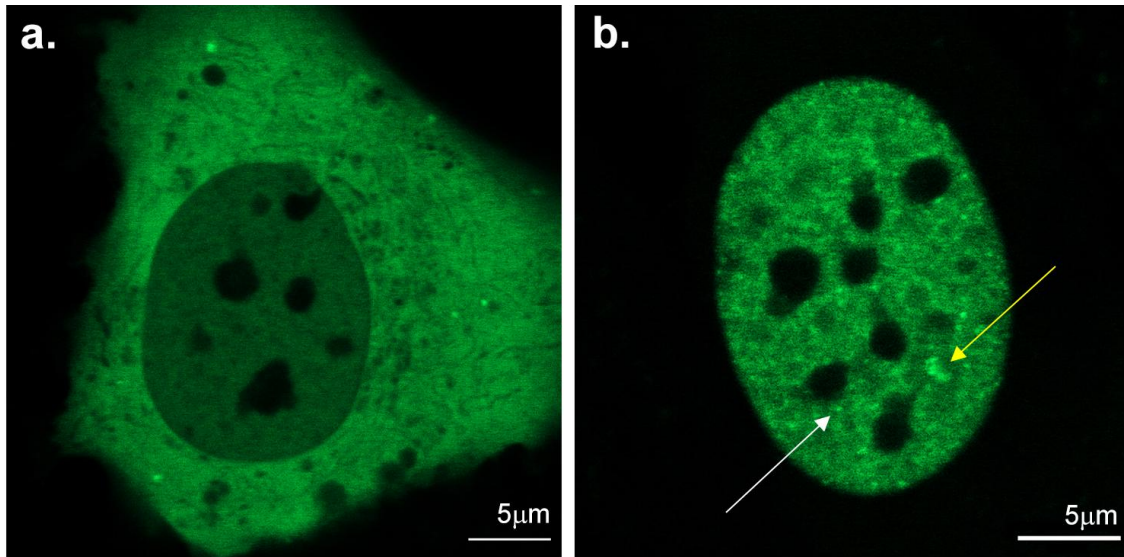


Figura 4.8. Células D4-GR-KO transfectadas con pEGFP-mGR y tratadas con vehículo (a) o Dex 10^{-8} M (b). Flecha amarilla: *array* MMTV. Flecha blanca: *foci*. Escala: 5 μ m.

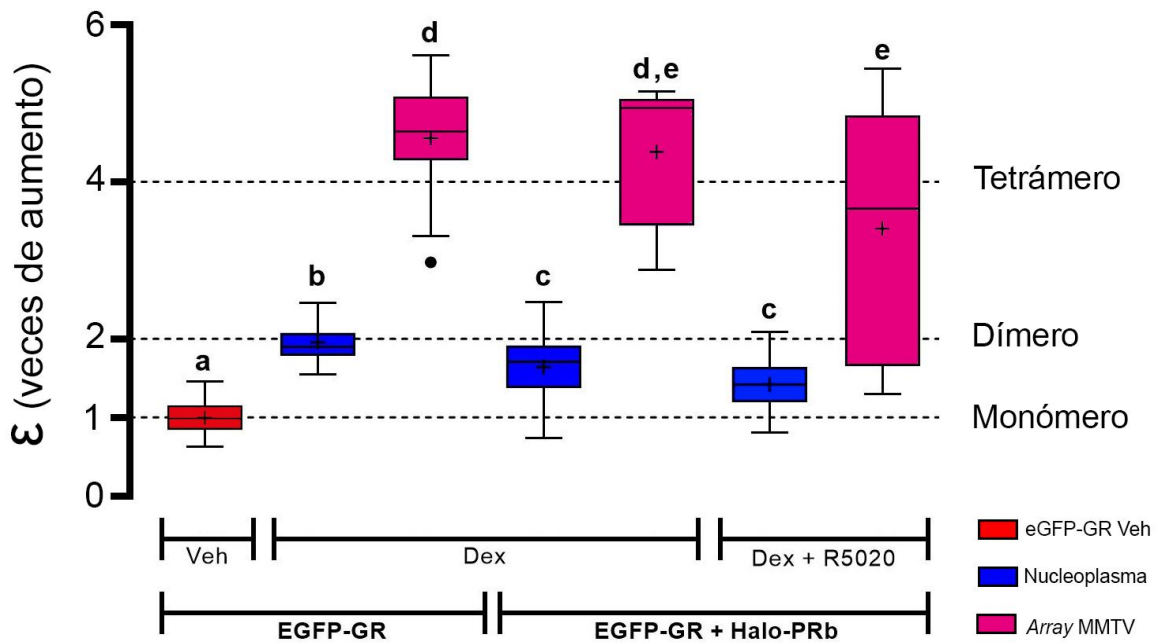


Figura 4.9. Estudio de oligomerización de GR mediante ensayos de N&B. Las cajas indican el estado de oligomerización de GR para cada situación experimental: GR en el núcleo (azul) y unido a ADN (rosa). En rojo se indica GR tratado con vehículo medido en el núcleo. La significancia estadística se determinó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$).

Para el caso de la co-transfección con pEGFP-mGR y pHalo-hPRb, estimulando con Dex 10^{-8} M, a la inspección visual las células presentaban menor translocación de GR al núcleo (**Figura 4.10.a**), mientras que la presencia de PR era tanto nuclear como citoplasmática (**Figura 4.10.b**). Si bien se observaron *foci*, impresionaban en menor cantidad que en el caso anterior, sugiriendo un efecto inhibitor del PR (sin activar) sobre el GR. De igual manera, la detección de GR unido a *arrays* MMTV fue escasa, lo que redundó en un muestreo final menor (sólo 5 células). En el caso de PR, siempre sin estimular en forma directa, no se observaron *foci* ni unión al *array* MMTV. El análisis del brillo ϵ (**Figura 4.9**) correspondiente a GR arrojó en el nucleoplasma valores de brillo relativo cercanos a 2 (1.64), con una media significativamente menor que la obtenida para GR sin PR estimulando con Dex (1.95), pero con una varianza mayor de los datos. Estos resultados sugieren la presencia de una población mixta de complejos con dos moléculas de GR junto a complejos conteniendo una sola molécula de GR. Esto se debe a que la técnica de N&B no puede diferenciar entre mezclas de distintos estados de oligomerización; y el valor de brillo resultante corresponde al promedio pesado de las contribuciones relativas de cada especie (Presman *et al.*, 2016). Por su parte, la comparación sobre el *array* MMTV no arrojó diferencias significativas en presencia o ausencia de PR.

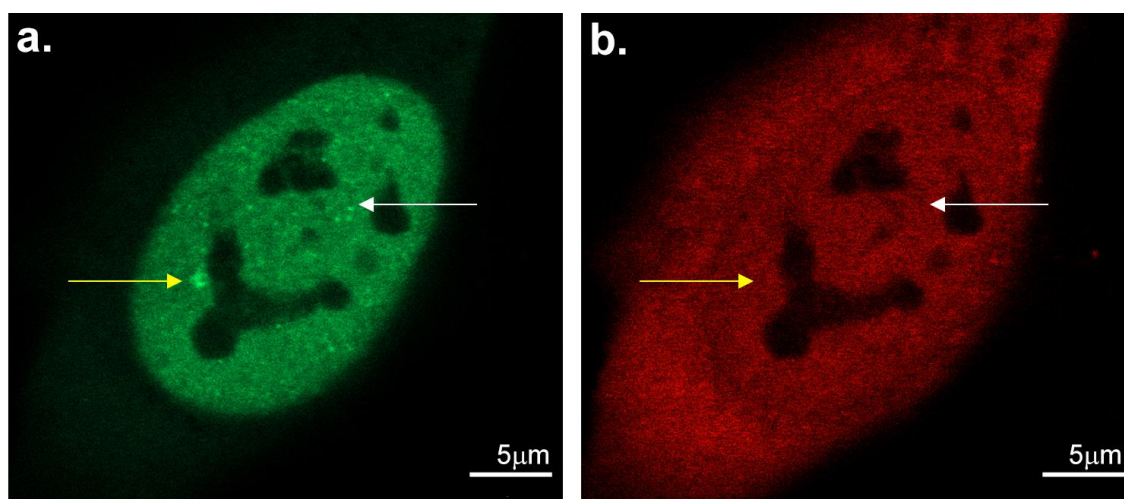


Figura 4.10. Célula D4-GR-KO transfectada con pEGFP-mGR y pHalo-hPRb, estimulada con Dex 10^{-8} M **a.** pEGFP-mGR. Flecha amarilla: *array* MMTV. Flecha blanca: *foci*. **b.** pHalo-hPRb marcado con sonda JF459. Se resaltan los mismos sitios que en **a**. No se observa *array* MMTV ni *foci*. Escala: 5 μ m.

Por último, para la co-transfección con pEGFP-mGR y pHalo-hPRb estimulando con Dex 10^{-8} M y R5020 10^{-8} M, obtuvimos los siguientes resultados. A la inspección visual, el GR presentó una localización mayormente nuclear, aunque con translocación incompleta (**Figura 4.11.a**). Para el PR, en cambio, la translocación fue casi completa (**Figura 4.11.b**). Sin embargo, no se puede realizar un análisis cuantitativo de la translocación con los datos obtenidos de N&B. En ambos casos, se observaron *foci* y unión al *array* MMTV, siendo más evidentes en el caso del PR. El análisis del brillo ϵ (**Figura 4.9**) para esta condición mostró una continuación de la tendencia observada para el caso anterior. En efecto, los valores de aumento respecto al monómero de GR en el nucleoplasma indican una media de 1.42 y escasa dispersión (0.32), lo que sugiere la presencia de una población mixta de dímeros y monómeros de GR. Por su parte, en la interacción con el ADN en los *arrays* de MMTV, se observó una distribución más heterogénea, con una media de 3.4 y gran dispersión (1.49), en rangos que podrían indicar diversos estados de oligomerización del GR. Si bien en este caso la muestra de células con *array* detectable que se pudieron analizar fue mayor ($n=12$), sigue siendo un número pequeño para definir conclusiones robustas. Sin embargo, la tendencia en los valores de las medias obtenidas es similar a las observadas en el nucleoplasma, sugiriendo estados de oligomerización menores y/o mixtos (**Figura 4.12**).

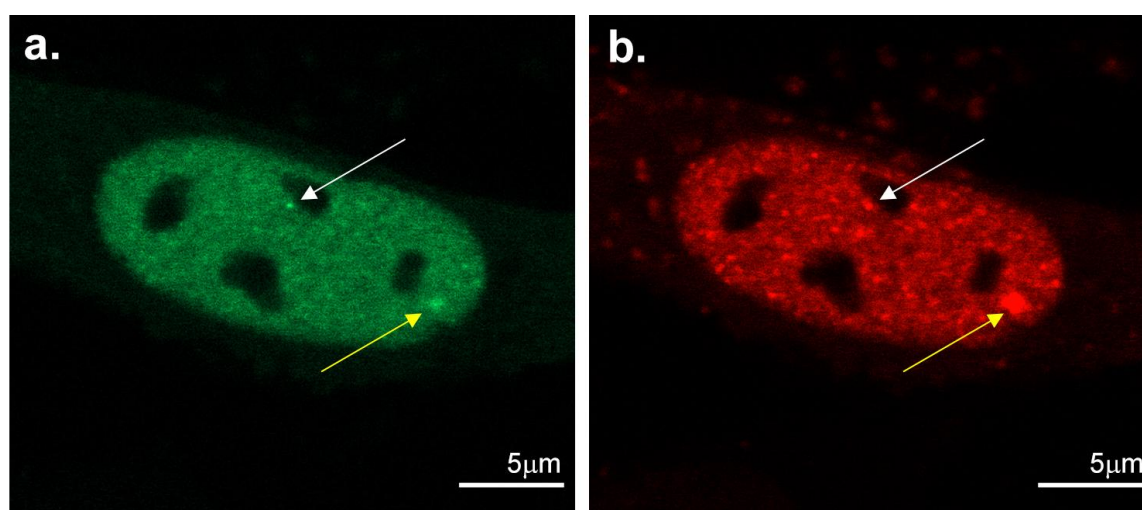


Figura 4.11. Célula D4-GR-KO transfectada con pEGFP-mGR y pHalo-hPRb, estimulada con Dex 10^{-8} M y R5020 10^{-8} M. **a.** pEGFP-mGR **b.** pHalo-hPRb marcado con sonda JF459. Flecha amarilla: *array* MMTV. Flecha blanca: *foci*. Escala: 5 μ m.

En conjunto, estos resultados indican que la presencia de PR, tanto activo como inactivo, alteraría la oligomerización que exhibe GR en el núcleo. Como mencionamos, GR se encuentra mayoritariamente como dímero en el núcleo. Entonces, los valores de brillo ϵ medio del GR activo disminuidos podrían corresponder a estados de oligomerización intermedios (**Figura 4.12**), indicando que se podría estar detectando una población mixta de complejos con dímeros y monómeros de GR, sugiriendo la interferencia del PR sobre la oligomerización del GR. Asimismo, si bien la muestra sobre los *arrays* MMTV es subóptima, es posible observar la misma tendencia en el GR unido a ADN.

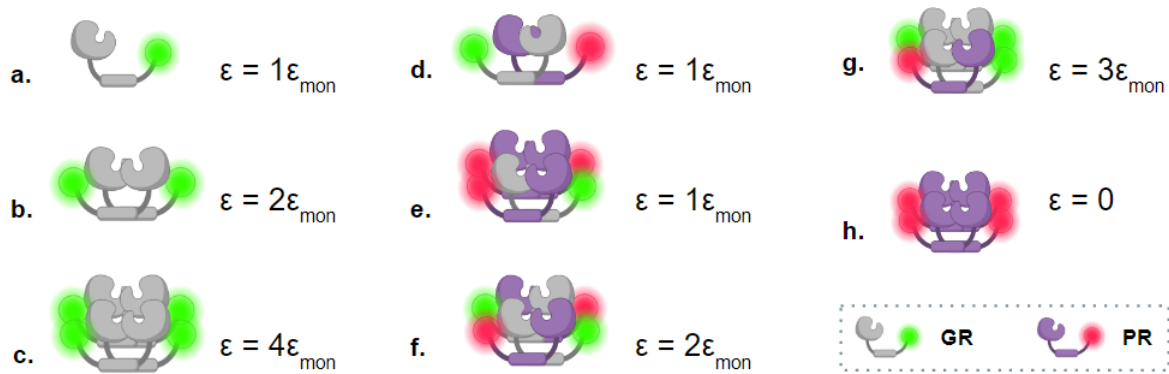


Figura 4.12. Posibles estados de oligomerización de EGFP-GR y su correspondiente brillo ϵ . Se incluyen los estados descriptos para GR **a.** monómero **b.** homodímero **c.** homotetrámero (Presman *et al.*, 2016), y los hipotéticos heterocomplejos GR-PR propuestos (**d-g**). **h.** Los homocomplejos de pHalo-hPRb + sonda JF549 de cualquier estequiometría no son detectados al analizar el canal para pEGFP-hGR ($\epsilon=0$).

Para completar estas observaciones, será necesario el estudio del comportamiento de PR en las condiciones descriptas para determinar su estado de oligomerización y poder, por un lado, confirmar la presencia de heterocomplejos GR-PR, y luego, caracterizar sus diferentes configuraciones estequiométricas posibles.

Correlación cruzada de brillo (*Cross-Correlation Brightness, Bcc*)

A partir de los datos obtenidos para N&B se puede calcular un parámetro adicional denominado correlación cruzada de brillo (*Cross-Correlation Brightness, Bcc*) que permite analizar si dos moléculas forman parte de un mismo complejo o se mueven de manera independiente, a condición de que su emisión de fluorescencia pueda ser discriminada entre sí (Digman *et al.*, 2009). Los detalles específicos de este método se describen en la sección **6.2.9**. Brevemente, el parámetro Bcc se obtiene mediante la ecuación:

$$B_{cc} = \frac{\sigma_{cc}^2}{\sqrt{\langle I_G \rangle \langle I_R \rangle}} \quad \text{Ec. (4)}$$

y se calcula para todos los pixeles que conforman una región de interés. Al representar los valores de Bcc obtenidos en un histograma, se puede evaluar estadísticamente la formación de heterocomplejos. Si este histograma está centrado en cero ($B_{cc} = 0$), implica que las fluctuaciones de intensidad entre los dos canales son independientes, indicando la ausencia de interacción (**Figura 6.1.a**, MCyE). Si existe una correlación positiva ($B_{cc} > 0$) implica que ambas partículas están interactuando y podrían formar parte de un mismo complejo (Digman *et al.*, 2009) (**Figura 6.1.b**, MCyE).

Se analizaron mediante este método los resultados obtenidos para células co-transfectadas con pEGFP-mGR y pHalo-hPRb, y estimuladas con Dex 10^{-8} M o con Dex 10^{-8} M y R5020 10^{-8} M. Los resultados mostraron en ambos casos valores de Bcc mayores a 0, indicando una interacción positiva entre GR activado y PR en estado activo o inactivo (**Figura 4.13**).

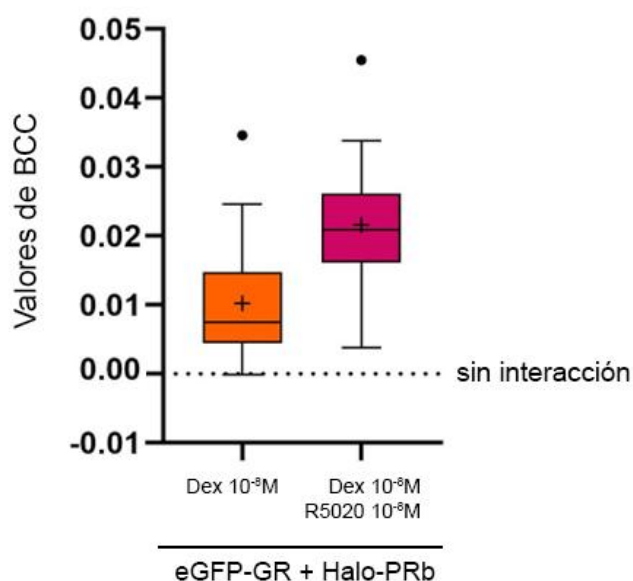


Figura 4.13. Análisis de Bcc de PR y GR en células D4-GR-KO transfectadas con eGFP-GR y Halo-PRb, estimuladas con Dex 10⁻⁸M (naranja) o Dex 10⁻⁸M y R5020 10⁻⁸M (rosa).

Por otro lado, observamos que los valores de Bcc al estimular con ambas drogas son mayores que con el tratamiento únicamente con Dex. Sin embargo, esta comparación puede conducir a conclusiones erróneas. Esto se debe a que el valor absoluto de Bcc depende de dos variables: la interacción entre las moléculas (positiva o nula) y el estado de oligomerización de las mismas. Por ejemplo, interacciones con estequiometría 2:2 (dímero-dímero) arrojarán valores más altos que 1:1 (monómero-monómero). Es decir, a igual proporción de moléculas que interaccionen, se pueden obtener distintos valores de Bcc dependiendo de la estequiometría del complejo. No obstante, si tomamos en consideración que las tendencias observadas en el estudio por N&B coinciden con las obtenidas por Bcc (en ambos casos la oligomerización de GR decrece), efectivamente esa diferencia podría asociarse a una mayor interacción de los dos receptores activados. Para soslayar las limitaciones de esta técnica, estos resultados deberán ser complementados con estudios por un ensayo de espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (*fluorescence cross-correlation spectroscopy*, FCCS), cuyas características permiten evaluar la interacción de moléculas unidas a dos fluoróforos diferentes, independientemente de su estado estequiométrico.

4.4 Análisis Estructural

El conjunto de los resultados experimentales anteriores sugiere una posible interacción entre GR y PR dentro del núcleo y en particular sobre el *array* HRE. Además, teniendo en cuenta la alta similitud de secuencia entre los DBD de ambos receptores y la capacidad mencionada en la introducción de este capítulo del GR de formar heterodímeros con el MR, consideramos un posible escenario donde heterodímeros GR-PR se unen a los HRE, con cada monómero DBD interactuando con cada hemisito del elemento de respuesta. Si la actividad transcripcional de este heterodímero fuera diferente que la del homodímero de GR, se podría proponer entonces un posible mecanismo por el cual el PR influye sobre la actividad transcripcional del GR.

En base a estas consideraciones, decidimos estudiar a través de simulaciones por dinámica molecular, la estabilidad de un putativo heterodímero GR DBD/PR DBD y compararla con la de los homodímeros GR DBD/GR DBD y PR DBD/PR DBD. Previamente, con el objetivo de identificar similitudes y diferencias entre los receptores, realizamos un análisis de las estructuras del GR DBD y PR DBD (PDB ID:3g6p, homodímero GR DBD en el sitio Fkbp5, y PDB ID:2c7a, homodímero PR DBD sobre el HRE usado para evaluar la actividad transcripcional 2c7a -HRE-Luc, ver **Tabla 4.1**).

Como ya se mencionó, el dominio DBD consiste en dos módulos de “dedos de zinc” que difieren entre sí en su conformación y función. Cada módulo tiene cuatro residuos de Cys que coordinan un único ion Zn^{++} , seguido de una hélice anfipática y un pequeño *loop* (**Figura 4.14.a**). La hélice H1 del primer dedo de zinc, también denominada “hélice lectora de ADN”, contiene un residuo arginina, que establece contactos específicos con los nucleótidos del surco mayor del ADN (**Figura 4.14.b**). En el segundo módulo, la hélice H2 mantiene contactos no específicos con el esqueleto del ADN en el surco menor, mientras que el *D-loop* proporciona contactos monómero-monómero, estabilizando la formación de los homodímeros (**Figura 4.14.b**). Una región conocida como *lever-arm* precede al *D-loop* y conecta ambos dedos de zinc. Tanto el *D-loop* como el *lever-arm* son regiones relevantes para la estructura y función del DBD, y mutaciones en esas regiones afectan la funcionalidad del receptor (Beck, De Bosscher and

Haegeman, 2011; Jewell *et al.*, 2012; Presman *et al.*, 2016; Álvarez, Presman and Pecci, 2017). En este sentido, está descrito en la literatura que cambios conformacionales del *lever-arm* tienen consecuencias funcionales en el GR; a su vez, esta región podría actuar como amplificador de señales desde el ADN a través de la H1 hacia otros dominios del receptor y/o hacia correguladores (Meijsing *et al.*, 2009). Por otro lado, nuestro grupo propuso, de acuerdo con observaciones obtenidas a partir de métodos computacionales, que la mayor movilidad del *lever-arm* está asociada a una menor actividad del receptor (Álvarez, Presman and Pecci, 2017).

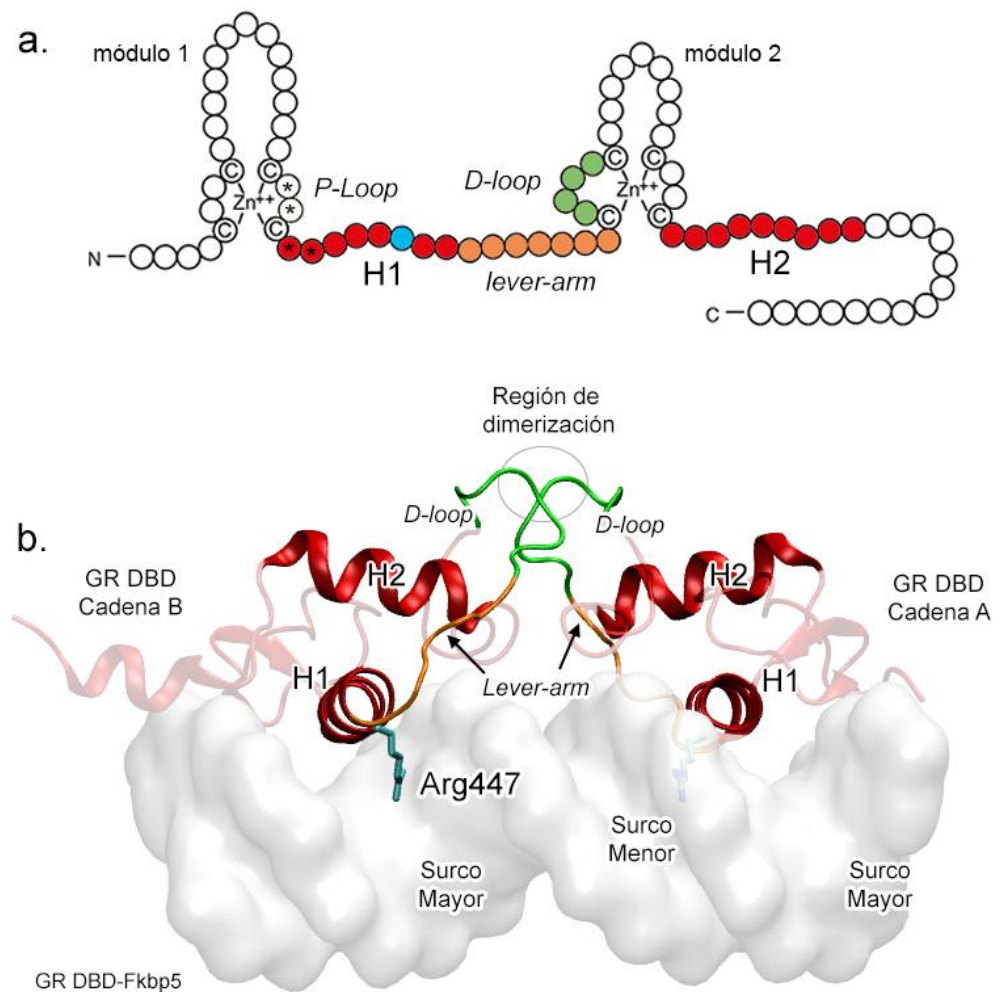


Figura 4.14. Esquema 2D de GR DBD (**a**) y 3D de GR DBD-Fkbp5 (PDB ID: 3g6p)(**b**). Se indican: hélices H1 y H2 en rojo, con Arg447 destacada en cian; *lever-arm* en naranja; los residuos formando el *P-loop* o *P-box* se marcan con asteriscos; *D-Loop* en verde, que en **b** forma la región de dimerización junto al D-Loop del monómero adyacente. En el esquema 3D, además, se indican los surcos mayores y menores del ADN.

Si bien presentan algunas leves diferencias, la conformación global del GR DBD y PR DBD resulta muy similar, así como también la disposición respecto al fragmento de ADN. La comparación de la secuencia primaria indica que sólo 10 aminoácidos difieren entre los DBD de ambos receptores (**Figura 4.15.a**).

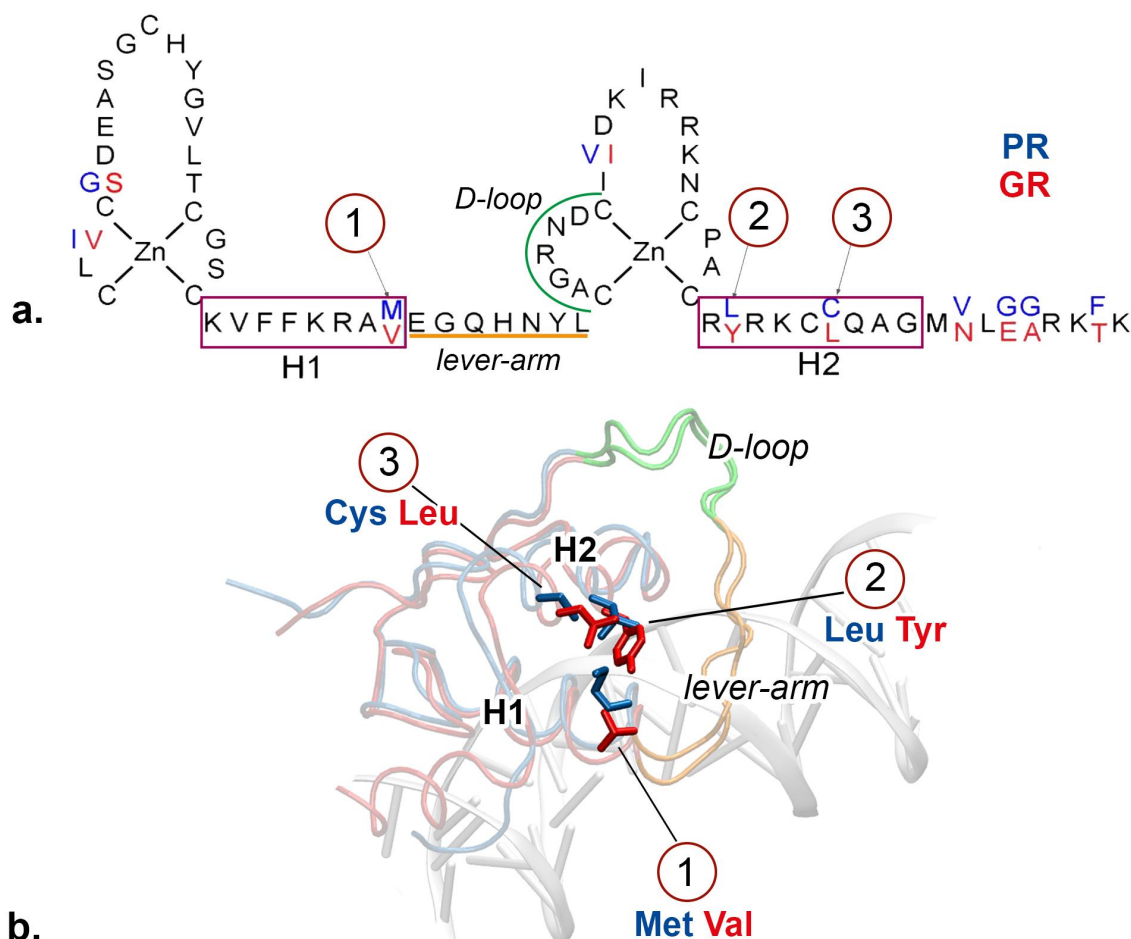


Figura 4.15. Estructura primaria (**a**) y terciaria (**b**) de GR-DBD y PR-DBD superpuestas marcando las diferencias entre PR (azul) y GR (rojo). Se indican las hélices H1 y H2, el *lever-arm* (naranja), el *D-loop* (verde) y los residuos V449/M595 (**1**), Y478/L624 (**2**) y L482/C628 (**3**), correspondientes a GR y PR respectivamente.

En particular, destacamos tres residuos con propiedades químicas distintas (**Figura 4.15 a y b**): Val449, Tyr478 y Leu482 en GR que en PR corresponden a Met595, Leu624 y Cys628, respectivamente. Estos aminoácidos se orientan hacia el núcleo hidrofóbico del DBD, interactuando entre sí. Cabe resaltar que la presencia de la Tyr478 en esa región del GR aporta un punto de anclaje para interacciones polares y/o del tipo aromáticas

que no pueden ocurrir en el PR, ni en los demás SRs, ya que no poseen un aminoácido con similares características en esa posición. Otra observación importante al comparar las estructuras de los monómeros de GR DBD es que la His453 (ubicada en el *lever-arm*) se presenta en dos conformaciones: hacia la superficie en un monómero (denominada *flipped*, cadena A) y hacia el interior en el otro (conformación *packed*, cadena B)(Figura 4.16.a).

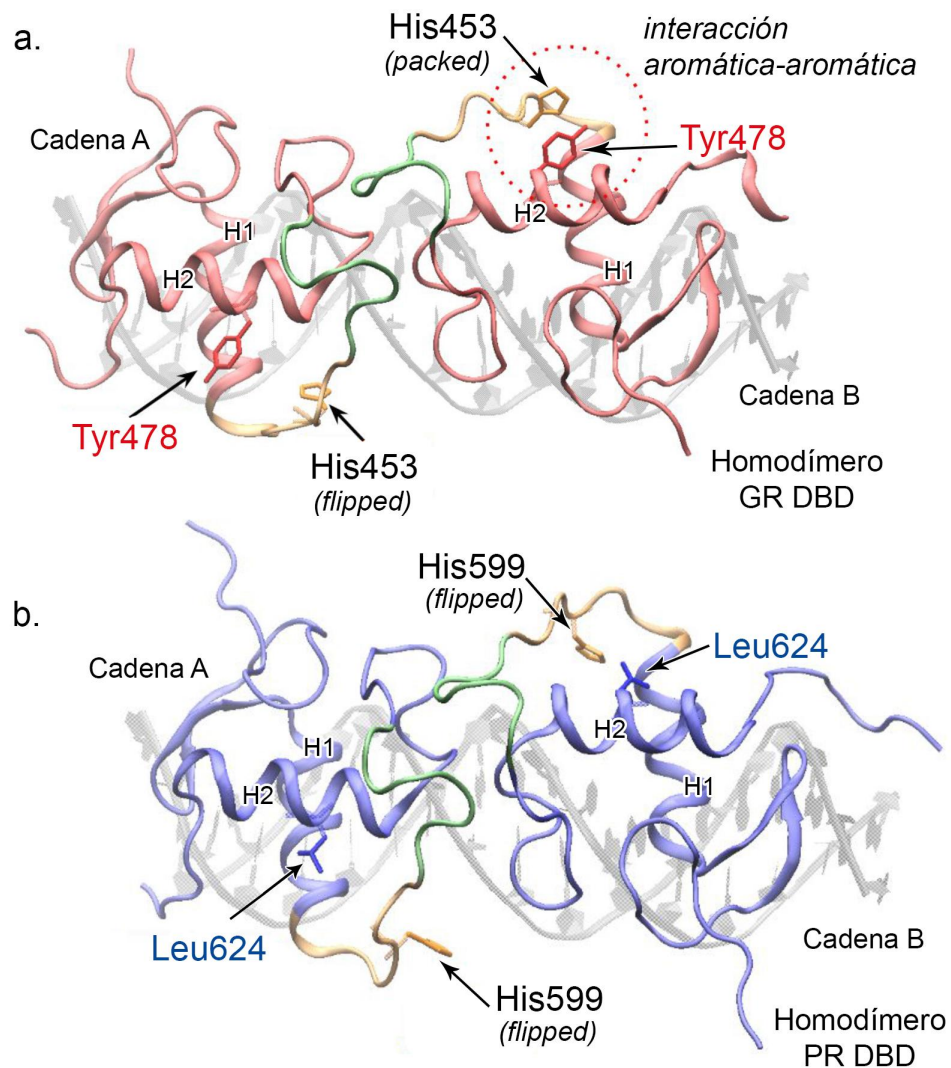


Figura 4.16. Estructura 3D de GR (a; rojo) y PR (b; azul). Se indican: His453/His599, Tyr478/Leu624, las conformaciones *flipped* y *packed* de His453 y la interacción aromática-aromática entre His453 y Tyr478; hélices H1 y H2 de cada monómero; región de dimerización (*D-loop*, verde); región relacionada con la actividad del receptor (*lever-arm*, naranja).

En busca de explorar si esta diferencia es una característica particular de esta estructura cristalina, se analizaron visualmente todas las estructuras existentes de GR DBD depositadas en el Protein Data Bank (38 estructuras en total). Encontramos que en todos los casos de dímeros GR α DBD salvajes unidos a un HRE, la His453 de uno de los monómeros fue asignada en una orientación y en el otro monómero en la otra. El análisis detallado muestra que en la conformación *packed* de His453, este residuo forma una interacción de tipo aromática-aromática (tipo apilamiento π - π) entre su cadena lateral y la cadena lateral de la Tyr478 (**Figura 4.16.a**). En la configuración *flipped* esta interacción no ocurre ya que los anillos aromáticos quedan alejados uno del otro.

En el PR DBD, la disposición asimétrica del residuo correspondiente a His453 (His599) no se observa, sino que adquiere la conformación *flipped* en ambos monómeros (**Figura 4.16.b**). Esta situación se origina en la ausencia de interacciones tipo aromática-aromática entre este residuo y la Leu624 correspondiente a la posición de Tyr478 en el GR, que al carecer de anillo aromático en su cadena lateral, anula la posible interacción con la His599 y su consecuente estabilización en la conformación *packed*. En conclusión, si bien la similitud de secuencia entre los DBD de ambos receptores es muy alta y su conformación global resulta muy similar, existen diferencias relevantes que podrían afectar tanto la estabilidad como el modo de interacción entre monómeros y su reconocimiento del ADN.

4.5. Simulación por MD del DBD de ambos receptores

Caracterizada la estructura general de los dominios DBD, a continuación realizamos un estudio computacional en busca de evaluar la estabilidad de heterodímeros de GR/PR unidos a ADN comparada a la de los correspondientes homodímeros. Para ello se ensamblaron cuatro sistemas a partir de las estructuras cristalográficas mencionadas (**Tabla 4.3**) y se llevaron a cabo simulaciones por MD, con un total de 5 réplicas independientes de 500 ns para cada sistema. Teniendo en cuenta la asimetría anteriormente descrita entre monómeros del GR, se generaron dos heterodímeros GR-PR: uno, tomando la cadena A del GR DBD (con la His453 en conformación *flipped*) y

la cadena B del PR DBD; el otro, de forma opuesta, con la cadena A del PR DBD y la cadena B del GR DBD (His453 *packed*). Todos los sistemas fueron simulados en presencia del fragmento de ADN conteniendo el HRE de la estructura PDB ID:2c7a, la misma secuencia analizada en los ensayos de expresión del gen reportero 2ac7-HRE-LUC. Los dedos de zinc de los DBD fueron parametrizados con el campo de fuerza ZAFF (Peters *et al.*, 2010), especialmente optimizado para estos casos. El análisis del estado de protonación de los residuos histidina (ver Materiales y Métodos) indicó que el valor de pKa para la His453 corresponde a una histidina con carga neta cero y protonada en el N epsilon.

SISTEMA	CADENAS PROTEICAS	ADN	NÚMERO DE RÉPLICAS	TIEMPO DE SIMULACIÓN
PR _A -PR _B	A,B: PDB ID:2c7a	PDB ID 2c7a	5	500 ns
PR _A -GR _B	A: PDB ID:2c7a B: PDB ID:3g6p			
GR _A -PR _B	A: PDB ID:3g6p B: PDB ID:2c7a			
GR _A -GR _B	A,B: PDB ID:3g6p			
GR _A -GR _A	A,A: PDB ID:3g6p		1	1000 ns
GR _A -GR _B Tyr478Cys	A,B: PDB ID:3g6p		1	500 ns

Tabla 4.3. Sistemas DBD/ADN simulados por dinámica molecular.

La estabilidad de los complejos proteína-ADN se analizó inicialmente mediante una inspección visual comparativa, seguida del monitoreo de la evolución temporal del RMSD respecto a la estructura inicial, medido sobre los átomos C α de la proteína (**Figura 4.17**). Este análisis revela que, salvo en algunas trayectorias, se obtuvieron

sistemas mayormente estables que convergen hacia valores constantes de RMSD. En el caso de los homodímeros PR_A-PR_B y GR_A-GR_B , solo una de las réplicas (#2 del PR_A-PR_B , curva color gris en **Figura 4.17**) mostró una alta desviación; el resto de las trayectorias exhibieron valores de RMSD estables y menores a 2 Å. En cambio, en los heterodímeros PR_A-GR_B y GR_A-PR_B se observaron, sobre todo en el segundo caso, trayectorias con valores de RMSD mayores, superiores a 2 Å. Teniendo en cuenta que los heterodímeros fueron contruidos a partir del homodímero PR-PR, es esperable una mayor variabilidad respecto a la estructura inicial, reflejando los reajustes que acontecen en cada monómero para adaptarse al otro receptor.

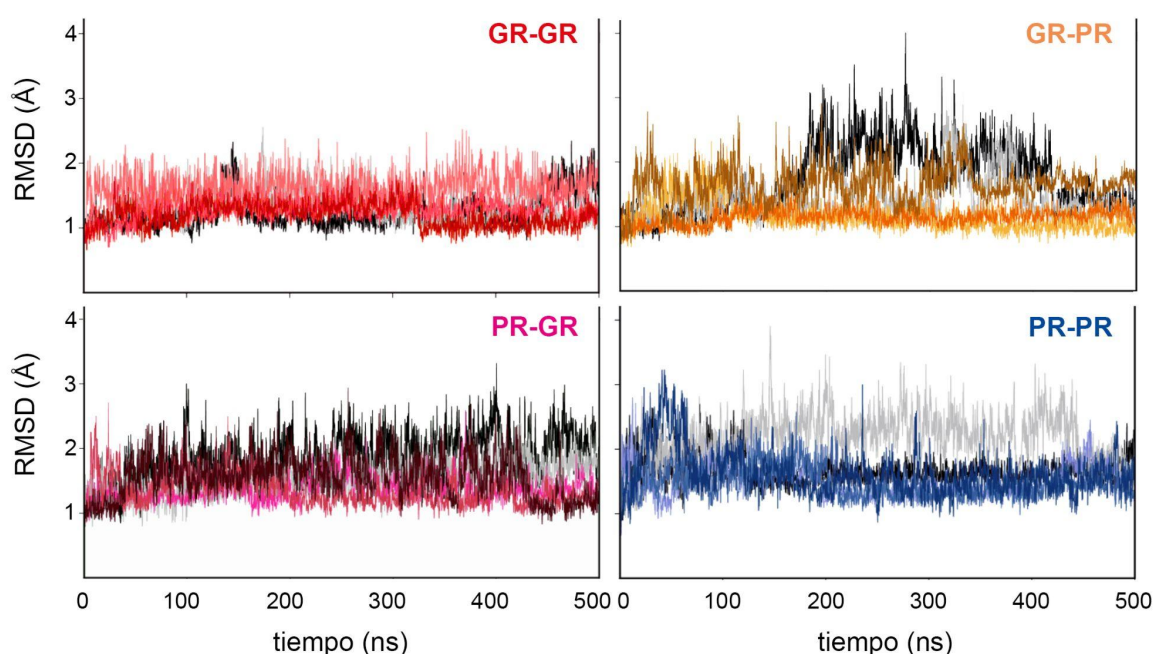


Figura 4.17. Superposición de RMSD de los 4 sistemas simulados, cada uno con 5 réplicas de 500 ns.

Para evaluar la movilidad de cada región en particular de las proteínas durante las simulaciones, se determinó el RMSF a partir de los últimos 400 ns de cada réplica y se graficó el promedio obtenido para cada monómero (**Figura 4.18**). Previsiblemente, los elementos de estructura secundaria (hélices H1 y H2 y la lámina β del primer dedo de zinc) exhibieron valores bajos de RMSF, prácticamente invariables entre sistemas. Por el

contrario, las regiones menos estructuradas correspondientes a *loops* presentaron mayor movilidad, siendo el *lever-arm* y el *D-loop*, las que exhibieron mayor amplitud. A la vez, encontramos notorias diferencias entre los monómeros A y B de los sistemas.

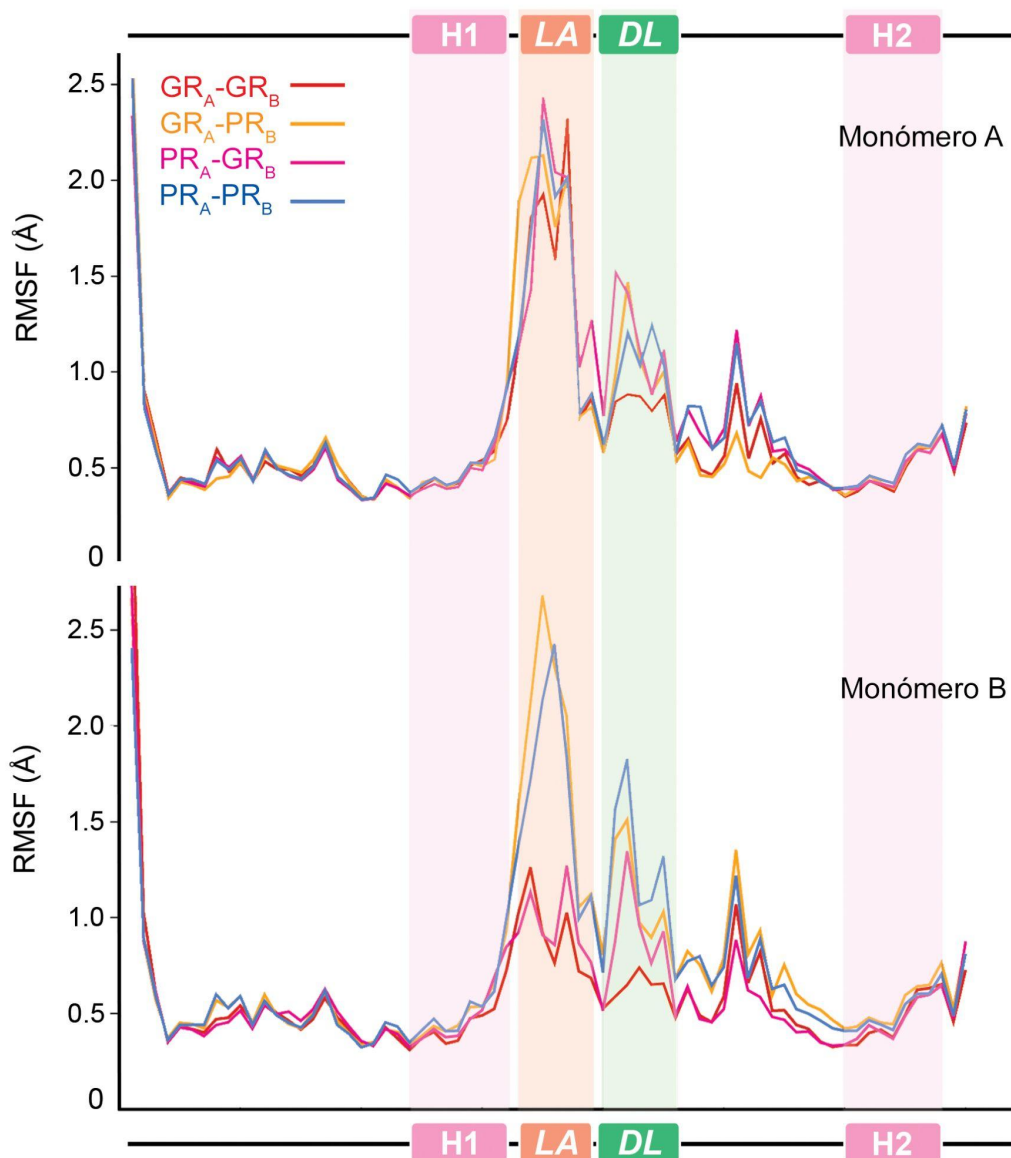


Figura 4.18. Superposición de RMSF de los monómeros A y B de los 4 sistemas simulados. Los sistemas con un *lever-arm* (LA, naranja) más móvil corresponderían a aquellos menos activos, en concordancia con descripciones previas (Meijsing et al., 2009; Álvarez et al., 2017). DL: *D-Loop*. H1: hélice 1. H2: hélice 2.

Para el caso del *D-loop*, el homodímero GR-GR (rojo en **Figura 4.18**) fue quien presentó la mayor estabilidad. En efecto, tanto el monómero A como el monómero B de

GR_A-GR_B poseen una menor movilidad que los monómeros GR simulados junto a PR o cualquiera de los monómeros PR. El PR_A-PR_B (azul) describió un comportamiento diferencial entre monómeros, siendo el D-loop de PR_B el más móvil (~1.8 Å), y el de mayor variación de todos los sistemas simulados. Los heterodímeros presentaron rangos de fluctuación similares entre sí.

El análisis del RMSF también revela que si bien en la mayoría de los monómeros el *lever-arm* es la región con mayor fluctuación, existen diferencias notables entre algunos sistemas. Así, mientras que los monómeros A mostraron valores muy similares, los monómeros B presentaron dos perfiles bien diferenciados: por un lado, los monómeros PR_B, con amplias fluctuaciones de aproximadamente 2.5 Å; por el otro, los de GR_B, de gran estabilidad. El análisis de las trayectorias revela que este comportamiento del *lever-arm* está relacionado a las distintas conformaciones de la His453 en esos sistemas: *flipped* para GR_A y *packed* para GR_B. Así, la interacción entre la His453 y la Tyr478 en la configuración *packed* restringe fuertemente la movilidad del *lever-arm*, a la vez que rigidiza también la interfase de dimerización del *D-loop*.

A continuación, se efectuó una categorización en grupos o *clusters* según el RMSD de los átomos de Ca del *lever-arm*, tomando los últimos 400 ns de cada réplica y separándolos por monómero. Además de la frecuencia de cada *cluster*, se obtuvieron las estructuras representativas para cada receptor (**Figura 4.19**). El análisis comparativo reveló que para todos los monómeros de GR, tanto en los homo como en los heterodímeros, se detecta un *cluster* principal altamente poblado, con porcentajes entre 75% y 84% para GR_A en GR_A-GR_B y GR_A-PR_B, respectivamente, y valores aún más altos, 92% y 94%, para GR_B en GR_A-GR_B y PR_A-GR_B, respectivamente. Por el contrario, la clusterización de los monómeros del PR arroja varios *clusters* con población apreciable, tanto en el caso PR_A como en el de PR_B, no superando el más representativo una frecuencia del 55%. Estos resultados revelan nuevamente una mayor flexibilidad estructural para el PR en comparación al GR.

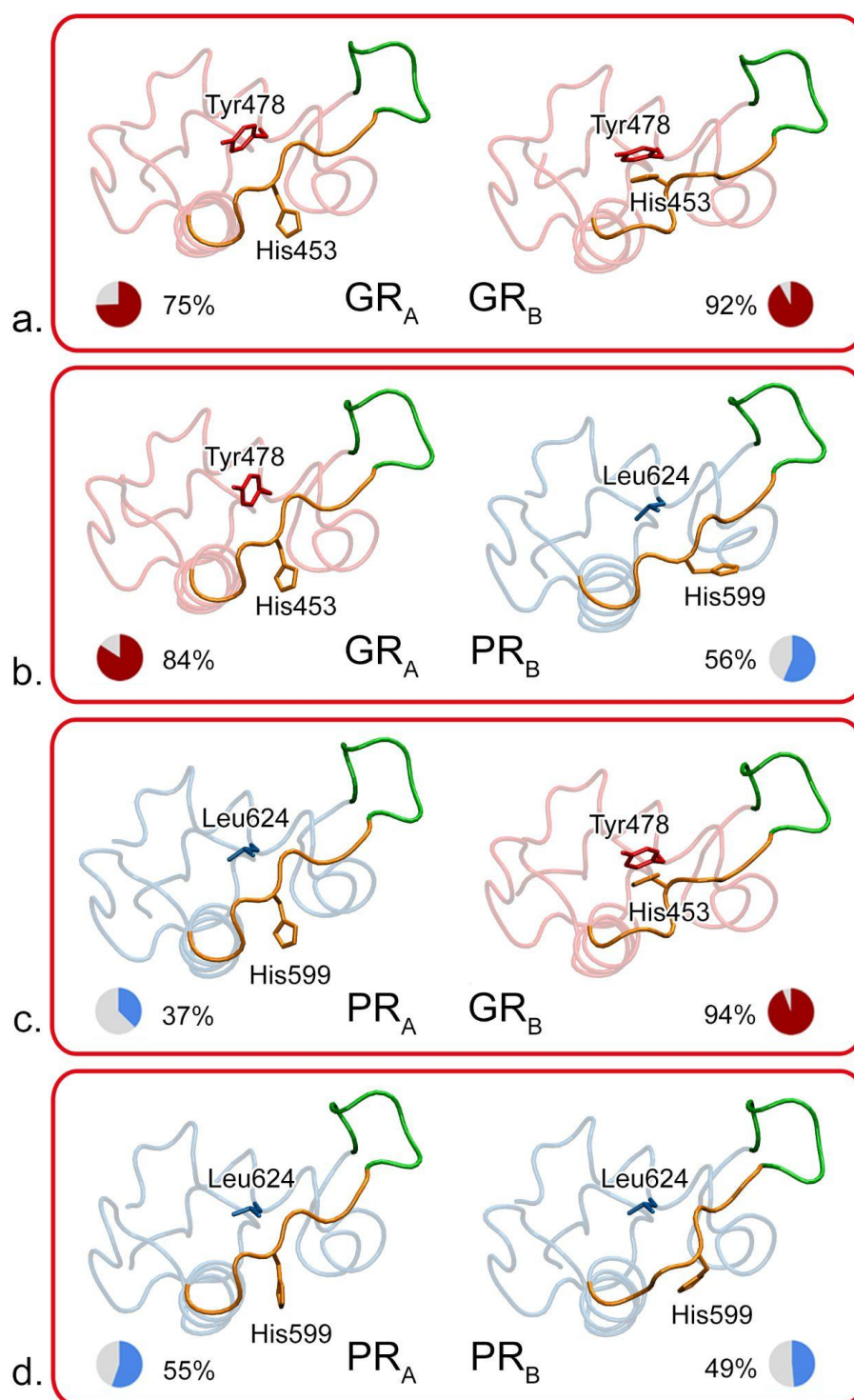


Figura 4.19. Cada caja encierra las estructuras representativas del par de monómeros que componen el dímero simulado. Los monómeros están representados en la misma orientación para facilitar la comparación visual. Rojo: GR, Azul: PR, Naranja: *lever-arm*, Verde: *D-loop*. Los gráficos de torta muestran el porcentaje de representatividad del clúster mayoritario.

Para continuar con la evaluación del papel de la His453 en la estabilidad del homodímero GR-GR y la asimetría estructural entre monómeros del GR, se ensambló un nuevo sistema GR_A-GR_A (**Tabla 4.3**), en el cual ambas His453 están inicialmente en la conformación *flipped*. Luego, se llevó a cabo una simulación por MD de 500 ns de este sistema en las mismas condiciones utilizadas anteriormente. Inspeccionando visualmente la trayectoria resultante, detectamos que, alrededor de los 380 ns, la cadena lateral de la His453 de uno de los monómeros sufre un cambio conformacional abrupto, desde la conformación *flipped* inicial hacia la orientación *packed*. Este cambio queda evidenciado al monitorear la evolución temporal de la distancia entre los centros de masas de los anillos aromáticos de la His453 y la Tyr478 (**Figura 4.20a**). Con el objetivo de analizar la estabilidad de la configuración alcanzada, se extendió la simulación hasta un total de 1000 ns, confirmando que ese cambio conformacional persiste hasta el final de la simulación (**Figura 4.21**). El cálculo del RMSF al principio y al final de la simulación permite confirmar cómo afecta la formación del contacto His452-Tyr478 a la movilidad del *lever-arm* (**Figura 4.20b**). De esta manera, logramos capturar el pasaje desde una configuración simétrica hacia una configuración asimétrica del homodímero GR-GR.

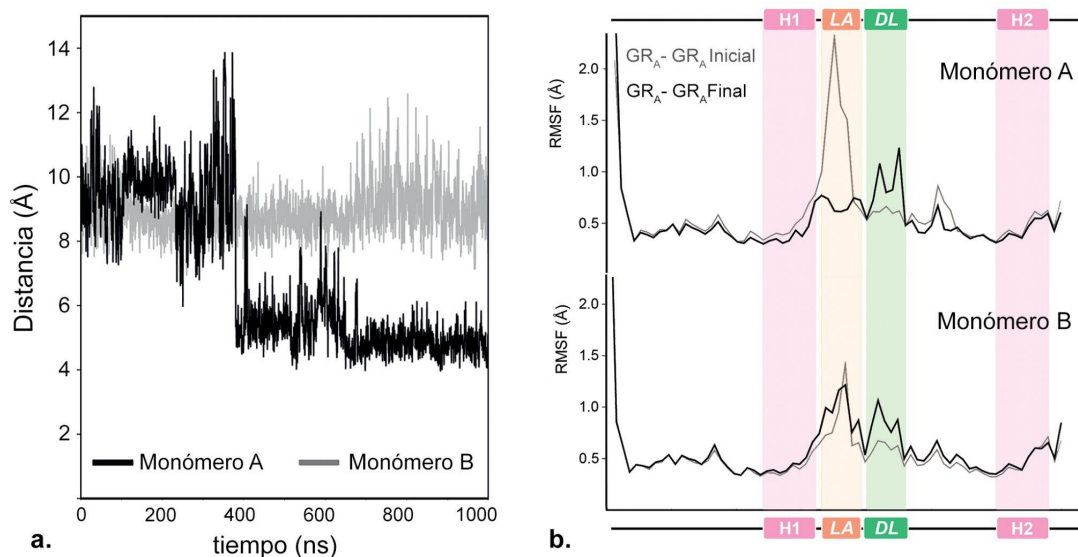


Figura 4.20 Evolución del sistema GR_A-GR_A. **a.** Distancia entre His453 y Tyr478 a lo largo de la simulación. En negro se indica el monómero A en que la His453 cambia de orientación hacia *packed*. **b.** RMSF de la trayectoria calculado sobre los primeros 300 ns (gris) y los últimos 300 ns (negro).

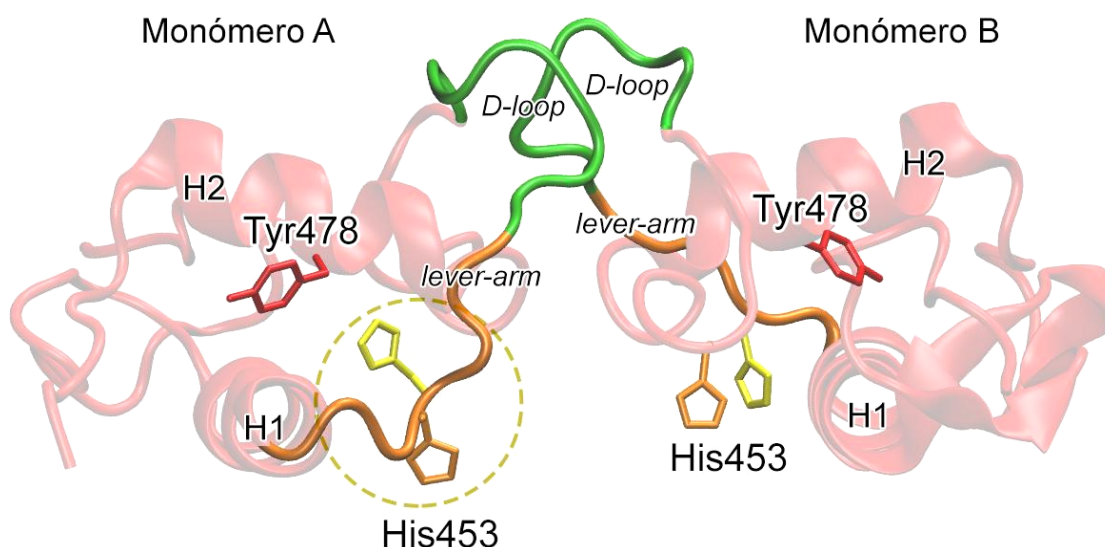


Figura 4.21. Sistema GR_A-GR_A. Posiciones inicial (naranja) y final (amarillo) de H453. El círculo punteado muestra el cambio de *flipped* a *packed* de la H453 de uno de los monómeros. Verde: D-loop. Naranja: lever-arm.

Por último, la revisión de la literatura en busca de reportes de mutaciones del GR DBD, reveló un dato interesante para nuestra investigación: Vitellius *et al.*, trabajando sobre muestras de pacientes con síndrome de resistencia a glucocorticoides o *Síndrome de Chrousos*, demostraron que la mutación puntual c.1433A>G en el gen NR3C1 deriva en la sustitución Tyr478Cys, afectando la actividad transcripcional del GR (Vitellius *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta nuestros resultados en la caracterización del rol de la Tyr478 en el mantenimiento de la asimetría del homodímero GR-GR, decidimos evaluar el posible impacto de la mutación Tyr478Cys sobre la posición de la His453, la movilidad del *lever arm* y, en consecuencia, la actividad del receptor.

Se generó el sistema GR_A-GR_B Tyr478Cys con dicha sustitución en ambos monómeros y se simuló por MD de 500 ns como los sistemas anteriores (**Tabla 4.3**). Como se observa en la **Figura 4.22.a**, la His453 del monómero B, inicialmente en posición *packed* interactúa brevemente con la Cys478, pero hacia los 100 ns vira hacia la conformación *flipped*, lo cual queda reflejado en el súbito y sostenido aumento en la distancia entre ambos aminoácidos. Como consecuencia de este cambio conformacional, se afecta

notoriamente la estabilidad del *lever-arm* de este monómero, incrementando su movilidad (**Figura 4.22.b**).

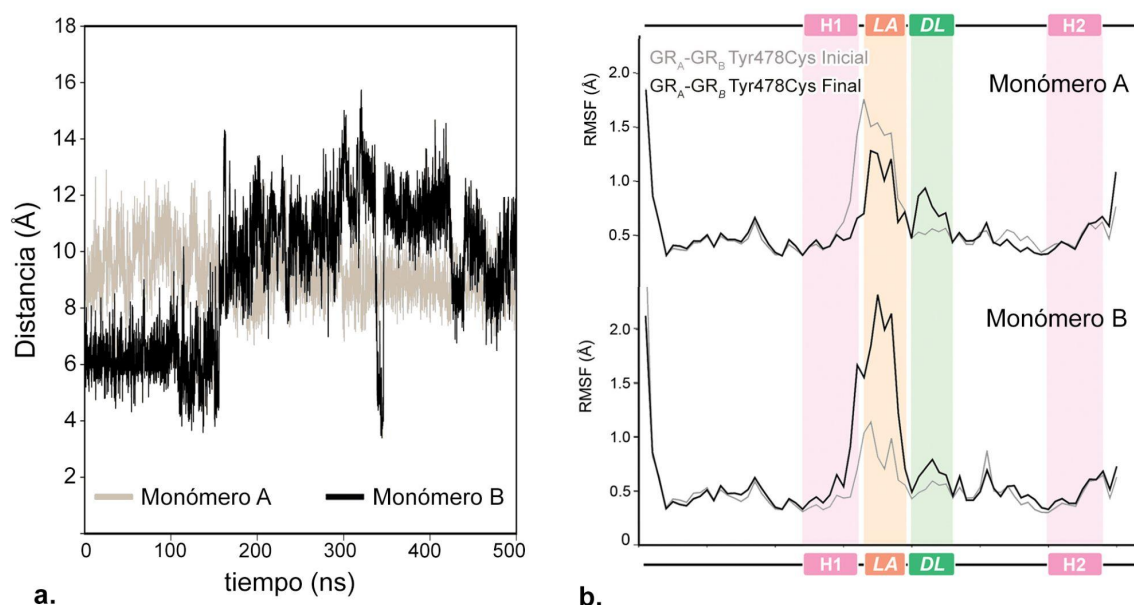


Figura 4.22. Evolución del sistema GR_A-GR_B con la mutación Tyr478Cys en ambos monómeros. **a.** Distancia entre His453 y Cys478 a lo largo de la simulación. En negro se indica el monómero con la His453 en posición *packed* inicial, que luego cambia a *flipped*. **b.** RMSF de la trayectoria calculado sobre los primeros 100 ns (gris) y los últimos 100 ns (negro) para los monómeros A (inicialmente *flipped*) y B (inicialmente *packed*).

4.6. Conclusión

Los múltiples ensayos de genes reporteros realizados confirman una interferencia transcripcional entre los receptores GR y PR que ya fuera propuesta previamente por nuestro grupo (Ogara et al, 2019). Por un lado, la sobreexpresión de los receptores evidenciaron la interferencia de PR independiente de ligando sobre la actividad del GR. En otras palabras, la mera presencia del PR afectaría la actividad transcripcional del GR. Por otro lado, el estudio de la relación GR-PR con abundancias relativas PR/GR decrecientes estableció los límites para la interferencia dependiente de ligando (en donde el PR estimulado con R5020 10^{-8} M interfiere con el GR estimulado con Dex 10^{-8} M). La suma de los resultados obtenidos en estos ensayos evidencian una interferencia transcripcional *in culture* entre los receptores GR y PR y apoyan la posibilidad de una interacción funcional directa entre ambos receptores.

En busca de evaluar esta hipótesis utilizamos microscopía de fluorescencia de alta resolución en células vivas, encontrando que la presencia de PR por sí sola reduce la formación de homodímeros GR-GR observada cuando el GR es estimulado con Dex. Este resultado podría explicar lo observado en los ensayos de genes reporteros sobre la interferencia ejercida por PR en ausencia de ligando. Por otro lado, cuando ambos receptores son activados por sus ligandos respectivos, los niveles nucleares de homodímeros GR-GR son aún más bajos. Además, se observó una interferencia similar al evaluar el estado de oligomerización del GR cuando este se recluta en sitios HRE. Por último, los ensayos de correlación cruzada de brillo mostraron que el PR forma parte del mismo complejo que el GR cuando ambos receptores están activados. Consideramos que el conjunto de estos resultados refuerzan nuestra propuesta de que PR y GR pueden formar heterocomplejos dentro del núcleo.

La extensión del análisis de esta interacción por métodos computacionales arrojó diversos resultados que sustentan la posibilidad de la existencia de un heterodímero GR-PR unido al ADN. Por un lado, observamos que los heterodímeros GR DBD-PR DBD y PR DBD-GR DBD mantienen uniones estables con el ADN y también entre ambos receptores, manteniendo una conformación global similar a la observada para los

homodímeros DBD. Sin embargo, detectamos diferentes comportamientos dinámicos entre los sistemas simulados. Mientras que el homodímero de GR fue el que mayor estabilidad mostró a lo largo de las dinámicas, con una movilidad muy reducida en el monómero que posee la His453 en conformación *packed*, el homodímero PR exhibió un comportamiento diferente, con gran flexibilidad a lo largo de las dinámicas, evidenciado, por ejemplo, por las múltiples poses detectadas en el proceso de clusterización. Esta característica del PR también se vio reflejada en la movilidad global de los heterodímeros, particularmente en la región de dimerización (*D-loop*), sin afectar, no obstante, la estructura global del complejo. Llamativamente, en el GR-PR en que GR presentaba la conformación *flipped*, el dímero mostró un comportamiento muy similar al homodímero PR-PR, mientras que en el GR-PR con GR en conformación *packed* se observó que el D-loop aumentaba su movilidad respecto del GR-GR, pero se mantenía en la región del *lever-arm*.

Teniendo en cuenta la correlación inversa entre la movilidad *lever-arm* y la actividad del GR anteriormente propuesta (Álvarez, Presman and Pecci, 2017), y que la mayor estabilidad del *lever-arm* está asociada a la conformación *packed* de la His453, proponemos, por un lado, que la conformación *packed* del GR sería un requisito necesario para la actividad del GR; por otro lado, que podría existir una interacción directa entre GR y PR formando un heterodímero sobre el ADN; y finalmente, que la movilidad aumentada del *lever-arm* observada en los heterodímeros podría explicar la menor actividad transcripcional de GR obtenida experimentalmente en presencia de PR.

CAPÍTULO 5.

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5.

DISCUSIÓN

El revolucionario poder terapéutico de los glucocorticoides significó un cambio de paradigma en el tratamiento de innumerables situaciones clínicas de pronóstico sombrío, tan frecuentes como el asma y tan graves como el shock anafiláctico. Su amplio espectro de aplicación y sorprendentes resultados los posicionaron rápidamente entre los fármacos más utilizados. Incluso luego de haberse establecido los severos efectos adversos causados por su empleo a altas dosis y/o en tratamientos prolongados, los GC siguen siendo de los medicamentos mayormente prescritos a nivel mundial (Cain and Cidlowski, 2015).

La historia del desarrollo de nuevos GC sintéticos fue comandada por la premisa de que ciertas conformaciones del receptor, consecuencia de la interacción con un ligando específico, podría emular los efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores ejercidos por el GR, mientras que no afectaría respuestas metabólicas o clínicamente adversas de los GC (Vettorazzi *et al.*, 2022). Esta propuesta, a la vez prometedora y desafiante, exige desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes a las acciones fisiológicas y farmacológicas de los GC.

Por su parte, el GR, mediador intracelular obligado de los de los GC, cumple un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes que participan en numerosos procesos fisiológicos. El estudio de esta proteína y de sus mecanismos de acción resulta entonces esencial para dilucidar la acción de los GC. Sin embargo, el complejo GR/GC, aunque imprescindible, es insuficiente para modular la transcripción de sus genes blanco por sí solo. En efecto, diversas moléculas se incorporan a la vasta lista de colaboradores en el proceso de plegar, activar, transportar y modular la actividad transcripcional del GR. Más aún, la diversidad de acciones de los GC ejecutadas de manera específica a nivel celular y tisular sólo puede explicarse mediante la selección de situaciones puntuales en la multiplicidad de escenarios posibles, resultantes de la combinatoria de acciones de los distintos actores involucrados.

Es en este contexto que los diferentes interactores del GR cobran relevancia supina en la investigación de las bases moleculares de la acción de los GC, representando un grupo heterogéneo, pero fundamental, de moléculas que rigen y determinan, en última instancia, los efectos del GR y la respuesta final a los GC. Por todo lo mencionado, en esta Tesis nos propusimos investigar las bases moleculares de la interacción del GR con una selección de diferentes moléculas que regulan su actividad, tanto desde un punto de vista estructural como funcional mediante métodos de modelado molecular y técnicas de biofísica y biología molecular, con el objetivo general de generar conocimiento que contribuya al desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la acción terapéutica de los glucocorticoides. El desarrollo de nuevos ligandos de interés farmacológico es un proceso largo, laborioso y costoso. La introducción de herramientas informáticas que permiten el análisis *in silico* del comportamiento de posibles compuestos con sus blancos terapéuticos, aunque todavía incipiente, promete reducir esos tiempos y esos costos. Particularmente, enfocamos nuestro estudio en interactores de dos de los tres dominios del GR: el LBD y el DBD.

El GR LBD fue el objeto de estudio de los capítulos 2 y 3 y su investigación fue abordada desde dos enfoques distintos: la interacción con ligandos y la interacción con correguladores. Aunque diferentes, estos enfoques comparten el elemento central que gobierna la comunicación alostérica entre el LBP y la región AF-2: la conformación de la H12. Entre los principales logros de esta Tesis al respecto podemos destacar: la adaptación de estructuras cristalinas para obtener el GR LBD en conformaciones no agonistas; la descripción del equilibrio dinámico de la H12 en diferentes condiciones del LBP para estimar la superficie de energía potencial de ese espacio configuracional; la obtención de un perfil de reclutamiento de péptidos correguladores y su correlación positiva con la actividad transcripcional de ligandos de variada actividad y la implementación de un método de *docking* proteína-péptido para estimar la energía de interacción entre el GR LBD y los correguladores.

El primer punto que discutiremos trata sobre la región N-terminal del GR LBD. Si bien la resolución de la estructura cristalina del complejo GR LBD/RU486 (PDB ID:3h52) resultó un gran avance para comprender el universo conformacional del receptor

(Schoch *et al.*, 2010), el desplegamiento de esta región ha impedido que esta estructura pueda ser utilizada en posteriores estudios computacionales. En efecto, para nuestro conocimiento, hasta el momento no se ha empleado esta estructura en simulaciones por MD. Sorprendentemente, Suren *et al.* (Suren *et al.*, 2018), quienes por la técnica de “pinza molecular” identificaron que esta región es la última en plegarse después de la entrada del ligando, no relacionaron sus hallazgos con el PDB ID:3h52, el cual, en definitiva, apoya fuertemente el modelo propuesto por estos autores. Nosotros sí encontramos la relación entre estos trabajos y propusimos que el desplegamiento de esa región en el PDB ID:3h52 no sería un artificio de la cristalización, sino que en las condiciones empleadas esa región no llegó a plegarse sobre el mismo monómero, haciéndolo sobre otros de la misma celda unidad. Esta observación nos indujo a pensar en la posibilidad de modificar *in silico* esa estructura, de forma de obtener nuevas coordenadas iniciales del GR LBD completamente plegado y en modo no agonista. Finalmente logramos construir estas estructuras y validar su estabilidad en las simulaciones por MD. Tras la publicación de nuestro trabajo (Alves, Pecci and Alvarez, 2020), Wang *et al.* lograron resolver la estructura del GR LBD en estado apo y unido a chaperonas (PDB ID:7kw7; (Wang *et al.*, 2022)). Notablemente, en esta estructura puede observarse que, efectivamente, la región N-terminal del GR LBD se encuentra desplegada en ausencia de ligando. Por otro lado, cabe mencionar la importancia que tiene este hallazgo en relación a los mecanismos de entrada y salida del ligando en el GR LBD, ya que, si bien Edman *et al.* realizaron estudios que indicaron que la región entre la H6 y la H7 podría ser la puerta de entrada del ligando (Edman *et al.*, 2015), estos fueron realizados empleando el GR LBD completamente plegado. La confirmación de la existencia de un estado apo parcialmente desplegado abre nuevas posibilidades para investigar el camino de ingreso del ligando al LBP.

El segundo punto a discutir es sobre la conformación de la H12 y su comportamiento dinámico. Es sabido que los estados nativos de las proteínas plegadas se caracterizan por un gran conjunto de conformaciones cuyas poblaciones relativas y dinámica de interconversión determinan el rendimiento funcional. Como consecuencia de los estudios por MD realizados en esta Tesis con las estructuras construidas a partir del PDB

ID:3h52, establecimos efectivamente que la H12 del GR LBD es dinámica y capaz de explorar una amplia gama de conformaciones, las cuales fueron claramente identificadas y caracterizadas mediante descriptores geométricos (**Figuras 2.11 y 2.12**). Más aún, encontramos que ese equilibrio dinámico depende de las condiciones de LBP, lo cual encaja dentro del modelo de selección conformacional para explicar el agonismo y el antagonismo en el GR. En trabajos recientes, posteriores a nuestra publicación, realizados tanto a través de métodos experimentales como computacionales, se presentaron conclusiones similares a las nuestras en cuanto al comportamiento dinámico de la H12. Por ejemplo, Köhler et al. utilizaron espectroscopía RMN para evaluar la dinámica del GR LBD en presencia de distintos ligandos y correguladores, identificando una vía de transmisión alostérica a través de la H12 que acopla dinámicamente el LBP con el dominio AF-2 (Köhler *et al.*, 2020), planteando que el intercambio dinámico entre diferentes formas y sus proporciones relativas es un mecanismo que regula la activación transcripcional, el cual está modulado por la estructura de cada ligando específico. También Shi et al. (Shi *et al.*, 2022) y La Sala et al. (La Sala *et al.*, 2021) aplicaron simulación por MD para estudiar el comportamiento dinámico de la H12 en presencia de diversos ligandos, explicando las diferencias de actividades e identificando los mecanismos alostéricos involucrados.

La conformación de la H12 en el GR LBD sin ligando ha sido tema de debate desde la primeras propuestas incluídas dentro del modelo del cambio conformacional inducido, proponiéndose que esta hélice se encuentra en un posición inactiva cuando el ligando no está unido. Analizando el comportamiento del GR LBD apo, encontramos que, si bien la H12 es un poco más flexible comparado a lo observado con el agonista Dex, la posición más favorecida coincide. Es decir, el empleo de métodos de muestreo avanzado revelaron que, en ausencia de ligando, la H12 se ubica preferentemente en el estado agonista (**Figura 2.20**). Contrariamente a este hallazgo, un estudio posterior de Hu et al. realizado con el GR LBD apo mediante simulación por MD, pero partiendo de la estructura cristalina del complejo con RU486 con la H12 parcialmente desplegada (PDB ID: 1nhz), indicó que, en ausencia de ligando el receptor puede visitar solamente estados antagonistas (Hu *et al.*, 2022). Sin embargo, la estructura recientemente

determinada por crio-EM del GR LBD apo asociado a chaperonas (PDB ID:7kw7; (Wang *et al.*, 2022)) exhibe efectivamente una H12 en una posición correspondiente a un estado agonista, apoyando nuestra conclusión. Consideramos que los resultados de Hu *et al.* podrían estar sesgados por partir de un estado desplegado de la H12, resultando el estudio por MD convencional mediante réplicas de solo 200 ns quizás insuficiente para obtener un muestreo completo del espacio configuracional de la H12.

En el caso del antagonista RU486, logramos caracterizar cómo el grupo voluminoso en C11 afecta la conformación de la H12 y su dinámica. Observamos una mayor flexibilidad del complejo antagonista comparado al sistema agonista (curva de energía potencial más plana, **Figura 2.20**), situación también descrita para otros antagonistas de SR (Duan *et al.*, 2016; Ng, 2016). Propusimos entonces que, en ausencia de correguladores, el estado de energía más bajo de la H12 se alcanzaría cuando esta hélice ocupa directamente el surco AF-2. A su vez, la presencia de correpresores estabilizaría conformaciones que amplían las dimensiones del dominio AF-2. Por lo tanto, la selección conformacional de la H12 es un equilibrio dinámico determinado en última instancia tanto por la identidad del ligando como por la presencia de correguladores. Si bien estos conceptos habían sido ya propuestos para otros NR usando tanto métodos computacionales como estudios de RMN (Chrisman *et al.*, 2018) (Brust *et al.*, 2018), para el caso del GR LBD, y en particular del modo de acción de RU486, se consideraban explicaciones más estáticas derivadas del análisis de las estructuras cristalinas. Al abarcar más ampliamente el espacio configuracional que la H12 puede adoptar en presencia de RU486 estamos aportando una visión más completa del modo de acción de este antagonista. A la vez, proporcionamos nuevos modelos iniciales para el diseño racional de nuevos análogos de glucocorticoides.

Una forma de evaluar cómo los ligandos definen, a través de la H12, la conformación global del dominio AF-2 es determinando el perfil de reclutamiento de correguladores. El ensayo de microarreglos con un amplio panel de péptidos resultó de gran utilidad para investigar la interacción entre el GR LBD, el ligando y el péptido. Satisfactoriamente, obtuvimos resultados que concuerdan con los antecedentes previos sobre estos ligandos (Dex, RU486, 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP), pudiéndose discernir

claramente entre perfiles agonistas y antagonistas (**Figuras 3.8 y 3.9**). Si bien esta tecnología había sido usada previamente con el GR endógeno de células de mieloma múltiple y de leucemia linfoblástica aguda para estudiar el reclutamiento de correguladores en presencia de Dex (Clarisse *et al.*, 2017), nuestros resultados muestran que también puede ser llevada a cabo con el GR LBD recombinante, y que tiene la capacidad de responder ante diferentes ligandos. Similares conclusiones fueron también obtenidas a partir de microarreglos de péptidos realizados con otros NR, como el caso de LXR (Alvarez *et al.*, 2020) o de ER (Li *et al.*, 2018).

En particular para Dex y RU486, podemos racionalizar la diferencia observada en el reclutamiento de péptidos con la diferencia en la conformación del dominio AF-2 observada por MD (**Figura 3.7**), originada por el comportamiento de la H12 que adquiere el GR LBD luego de la unión de cada uno de esos ligandos. Cabe destacar, sin embargo, que nuestros estudios computacionales indicaron también que, si bien con menos preferencia que en el caso del GR LBD/Dex, el complejo GR LBD/RU486 explora conformaciones compatibles con un estado agonista de la H12 y por lo tanto podría poseer un dominio AF-2 con capacidad de reclutar coactivadores con motivo LxxLL. Esto es lo que efectivamente se observa en el ensayo realizado con el microarreglo de péptidos, por ejemplo para ciertas cajas NR de coactivadores NCoA1 y NCoA2 (**Figura 3.10**).

Un análisis por MD de sistemas GR LBD/ligando/péptido podría haber resultado valioso para realizar una comparación con los resultados del microarreglo de péptidos. Sin embargo, dado el alto costo computacional que demanda un alto número de sistemas, elegimos un método de *docking* proteína-péptido para estimar la energía de interacción entre el GR LBD y los correguladores, del cual existían antecedentes positivos en otros sistemas proteína-péptido (Liu *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2017). Sin embargo, en nuestro caso, cuando se consideraron todos los péptidos con motivo LxxLL, no pudimos obtener una correlación lineal entre el valor de las energías de interacción calculadas por *docking*, y los valores de interacción determinados por el microarreglo de péptidos (**Figura 3.14**). Adjudicamos esta imposibilidad a las características intrínsecas limitantes del protocolo de *docking* empleado, el cual si bien

permite el reacomodamiento de las cadenas laterales de los péptidos y la proteína, no contempla posibles efectos alostéricos entre el receptor y el péptido. En este sentido, cabe destacar que cuando el análisis de la correlación fue restringido a los péptidos más similares al usado como molde, hemos podido rescatar cierta correlación entre las energías calculadas y los valores medidos experimentalmente (**Figura 3.15**). En conclusión, creemos que este método de *docking* podría tener la habilidad de predecir correctamente el modo y la energía de interacción péptido-proteína para los casos más sencillos, mientras que para casos más complejos, es decir, complejos que difieran más respecto de la estructura molde, será necesaria la aplicación de otros métodos computacionales para predecir correctamente la interacción.

En el capítulo 4 enfocamos nuestra investigación a la interacción entre el GR y el PR, tomando como base la similitud de secuencia entre ambos receptores y antecedentes previos del laboratorio (Ogara et al, 2019) que dan cuenta de una interferencia funcional cuando ambos receptores se encuentran expresados y activos en una misma célula. Entre los principales resultados obtenidos podemos destacar: la caracterización funcional de la interferencia del PR sobre la actividad transcripcional del GR luego de su reclutamiento a elementos de respuesta específicos; el cambio en el estado de oligomerización del GR en presencia del PR en el núcleo celular y en particular cuando el mismo se recluta a HREs que presenta el promotor MMTV y finalmente la confirmación de la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo cuando los mismos están estimulados por sus correspondientes ligandos específicos. Asimismo, logramos obtener simulaciones por MD de hipotéticos heterodímeros GR DBD/PR DBD unidos al ADN, a partir de las cuales pudimos establecer el papel determinante de una interacción sobre el comportamiento dinámico de este dominio, y así proponer una posible explicación para la interferencia del PR sobre el GR observada experimentalmente.

La suma de los resultados provenientes de los ensayos con genes reporteros que presentan diferente secuencia y número de HRE, evidencian una interferencia transcripcional *in culture* entre los receptores GR y PR y apoyan la posibilidad de una interacción funcional directa entre ambos receptores (**Figuras 4.1 a 4.5**). Sin embargo,

por las características propias de estos experimentos, los datos obtenidos corresponden a promedios poblacionales, sin información estequiométrica exacta sobre la configuración de los complejos. Es decir, a partir de estos resultados no podemos concluir si la formación de heterodímeros GR-PR ocurre, y si es la responsable de la respuesta transcripcional observada. Para profundizar sobre esta posibilidad, se utilizó microscopía de alta resolución, encontrando resultados que la apoyan fuertemente. Observamos, por un lado, que la formación de homodímeros GR-GR disminuye en presencia de PR (**Figura 4.9**), y por otro, que el PR es capaz de interactuar con el GR cuando ambos receptores están activados (**Figura 4.13**). Teniendo en cuenta el conjunto de estos resultados, junto a los antecedentes anteriormente mencionados sobre la existencia de complejos GR-MR (Mifsud and Reul, 2016; Le Billan *et al.*, 2018), consideramos que hay suficiente evidencia como para proponer que el GR forma heterocomplejos con el PR.

En base a esto realizamos un análisis estructural de los DBD de estos receptores, incluyendo simulaciones por MD de homodímeros y heterodímeros sobre un fragmento de ADN. En primer lugar, a partir del análisis de estructuras cristalinas del homodímero GR DBD unido a sitios HRE, identificamos una asimetría entre monómeros de GR DBD determinada por la conformación de la His453, la cual a su vez depende de si este residuo interactúa (conformación *packed*, *lever-arm* más rígido) o no (conformación *flipped*, *lever-arm* más flexible) con la Tyr478 (**Figura 4.16**). Aunque la asimetría entre monómeros del GR DBD ya fue descrita por Meijssing *et al.* (Meijssing *et al.*, 2009), su implicancia funcional no fue investigada en profundidad. Como se mencionó, recientemente se describió que la mutación puntual Tyr478Cys afecta la actividad transcripcional del GR (Vitellius *et al.*, 2016), derivando en una resistencia generalizada a glucocorticoides o *Síndrome de Crousos*. Éste se caracteriza por la insensibilidad parcial, aunque sistémica, a la acción de GC, presentando hipercortisolismo en ausencia de signos de tipo cushingoide. Nuestro estudio por dinámica molecular del homodímero de GR con la mutación Tyr478Cys demostró que dicha mutación deriva en la pérdida de la asimetría de la His453 (**Figura 4.22**). Teniendo en cuenta el genotipo heterocigota del paciente, los complejos de GR posibles serían los dímeros GRwt-GRwt,

GRwt-GR_{Tyr478Cys} y GR_{Tyr478Cys}-GR_{Tyr478Cys}. Hasta el momento, sólo se han descrito homocigotas para mutaciones en el GR LBD (Verouti, Hummler and Vanderriele, 2022), y presumiblemente la homocigosis de GR Tyr478Cys sea incompatible con la vida por la severa resistencia a GCs. En ese escenario, el homodímero del GRwt sería el único transcripcionalmente activo, y la resistencia a GC causada por Tyr478Cys podría explicarse no sólo por la actividad alterada del homodímero GR_{Tyr478Cys}-GR_{Tyr478Cys}, sino también por la regulación negativa de la actividad transcripcional del GR debido a la formación de heterodímeros GRwt-GR_{Tyr478Cys}, de manera similar a la regulación negativa del GR α por GR β mediante la formación de heterodímeros GR α -GR β (Duma and Cidlowski, 2010; Nicolaidis *et al.*, 2010; Oakley *et al.*, 2018).

Por lo tanto, teniendo en cuenta la correlación inversa entre la movilidad del *lever-arm* y la actividad del GR reportada previamente (Meijsing *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 2017), proponemos que, a diferencia del resto de los SR, la actividad transcripcional del GR depende, en cierta medida, de la mayor estabilidad del *lever-arm* conferida por la formación de la interacción His453-Tyr478. En este sentido, destacamos que por simulación por MD pudimos observar cómo partiendo de un homodímero simétrico (ambos GR DBD con la His453 en conformación *flipped*), el sistema recupera la asimetría (**Figuras 4.20 y 4.21**).

En segundo lugar, analizamos el comportamiento de los putativos heterodímeros GR DBD/PR DBD, encontrando sistemas que se mantienen estables a lo largo de las simulaciones, pero que presentan algunas diferencias respecto a los sistemas homodiméricos (**Figuras 4.18 y 4.19**). El comportamiento dinámico del heterodímero GR-PR se modifica de acuerdo a la asimetría conformacional descrita para la His453, presentando un perfil más similar al PR-PR cuando GR está en su conformación *flipped*, y a GR-GR cuando está en la posición *packed*. En consecuencia, la movilidad aumentada del *lever-arm* observada en los heterodímeros PR-GR *flipped* podría explicar la menor actividad transcripcional de GR observada experimentalmente en presencia de PR. Cabe mencionar que similares estrategias de simulación por MD fueron recientemente empleadas con el AR para explicar su diferente interacción con distintos elementos de respuesta (Bagherpoor Helabad, Volkenandt and Imhof, 2020).

En resumen, consideramos que el conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permitieron ampliar los conocimientos existentes sobre la estructura y función del receptor de glucocorticoides en diferentes contextos y en relación a los múltiples interactores que regulan su actividad: ligandos, correguladores y otros factores de transcripción.

Hace más de 70 años, los glucocorticoides irrumpieron en la farmacología y transformaron la clínica. Décadas de intenso estudio aumentaron el conocimiento sobre estas moléculas y contribuyeron a su actual entendimiento. Hoy, en la era de la genómica y del *big data*, el futuro de la investigación de los glucocorticoides plantea un escenario liderado por la colaboración de abordajes interdisciplinarios y por paradigmas superadores que incluyan la multiplicidad de actores involucrados y contemplen la inherente complejidad de los sistemas biológicos.

CAPÍTULO 6.

MÉTODOS COMPUTACIONALES y EXPERIMENTALES

CAPÍTULO 6.

MÉTODOS COMPUTACIONALES y EXPERIMENTALES

6.1. Métodos computacionales

6.1.1. Complejos ligando-GR LBD

6.1.1.1 Estructuras GR LBD iniciales. Inicialmente se construyeron cinco estructuras GR LBD para las simulaciones MD (**Tabla 2.1**). Las coordenadas GR LBD^{Ag} se tomaron de la estructura cristalina del complejo GR LBD/dex (residuos 528 a 777 de la cadena A de PDB ID:1m2z). GR LBD^{Ant1}, GR LBD^{Ant2} y GR LBD^{Ant3} se construyeron combinando coordenadas de dos estructuras cristalinas: los residuos 528 a 554 de la cadena A del complejo GR LBD/dex (PDB ID:1m2z) y los residuos 555 a 777 de la cadena A, B o C de la estructura cristalina del complejo GR LBD/RU486 (PDB ID: 3h52). Las regiones faltantes en GR LBD^{Ant2} y GR LBD^{Ant3} (**Tabla 2.1**) se modelaron con el software Modeller (Webb and Sali, 2016). En todos los casos, las mutaciones introducidas se revirtieron para recuperar la secuencia de GR LBD de tipo salvaje. Usando las coordenadas GR LBD^{Ag}, GR LBD^{Ant1} y GR LBD^{Ant2}, se prepararon 9 sistemas (3 apo y 6 holo) para simulaciones MD clásicas (**Tabla 2.2**). Para GR LBD^{Ag}/dex, GR LBD^{Ant1}/RU486 y GR LBD^{Ant2}/RU486, se conservaron las coordenadas cristalinas de los ligandos. Las coordenadas del ligando se eliminaron directamente para obtener sistemas apo, mientras que para los sistemas cruzados GR LBD^{Ag}/RU486, GR LBD^{Ant1}/dex y GR LBD^{Ant2}/dex, las estructuras optimizadas HF/6-31G** de los esteroides se introdujeron en el GR LBD superponiendo los átomos de carbono del esqueleto de los anillos C y D con los átomos correspondientes del esteroide cristalizado. Para los parámetros del campo de fuerza de los ligandos, se calcularon las cargas parciales atómicas RESP (potencial electrostático de restricción) usando el método HF/6-31G** en el programa de química cuántica Gaussian 09 (Frisch and Others, 2009) en las estructuras optimizadas correspondientes.

6.1.1.2. Simulación de dinámica molecular clásica del GR LBD. La simulación de dinámica molecular se realizó con el paquete de software AMBER 18. Los parámetros del ligando se asignaron de acuerdo con el campo de fuerza general AMBER (GAFF) y las cargas RESP correspondientes utilizando Antechamber. Los parámetros del campo de fuerza FF14SB se usaron para los residuos del receptor. Los complejos se sumergieron en una caja octaédrica de moléculas de agua TIP3P utilizando el módulo Tleap, dando sistemas finales de aproximadamente 35.000 átomos. Los sistemas se optimizaron inicialmente y luego se calentaron gradualmente hasta una temperatura final de 300 K. Todas las corridas de producción de MD de 500 ns se realizaron a 300 K a presión constante utilizando condiciones de contorno periódicas y el método Ewald de malla de partículas (espaciado de rejilla de 1 Å) para el tratamiento de interacciones electrostáticas de largo alcance con un plasma neutralizante uniforme. La regulación de la temperatura se realizó utilizando un termostato Langevin con una frecuencia de colisión de 2 ps⁻¹. El algoritmo SHAKE se usó para mantener los enlaces que involucran átomos de H en su longitud de equilibrio, lo que permitió el uso de un paso de tiempo de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton.

6.1.1.3. Simulación de dinámica molecular dirigida del GR LBD. El RMSD de los átomos de Ca de los residuos H3 (556 a 579), H10-H11 (711 a 740) y H12 (751 a 766) se empleó como variable colectiva (CV) tal como se implementa en el paquete Amber (Coutsias, Seok and Dill, 2004). Los sistemas GR LBD^{Ant1} (CV = 0 Å) y pseudo-GR LBD^{Ant3} (CV = 5,1 Å) equilibrados por cMD se utilizaron como puntos iniciales y finales, respectivamente, para dirigir las trayectorias SMD de 100 ns con una constante armónica de fuerza de 300 Kcal/molÅ² en presencia de Dex, RU486 o sin ligando.

6.1.1.4. Umbrella Sampling del GR LBD. Se extrajeron 25 instantáneas con una CV equidistante de 0,2 Å de las trayectorias SMD y se prepararon para simulaciones de *Umbrella Sampling* utilizando parámetros como para cMD. Se realizaron tandas de producción de 3 ns como para cMD. Solo los últimos 2 ns se integraron a través del método *Umbrella Integration* (Kästner and Thiel, 2005).

6.1.1.5. Análisis de resultados. Las trayectorias se analizaron con CPPTRAJ (Roe and Cheatham, 2013). La agrupación de trayectorias en *clusters* se realizó mediante el algoritmo de *clusterización* DBSCAN usando el RMSD como parámetro. Las instantáneas representativas se visualizaron con VMD (Humphrey, Dalke and Schulten, 1996). Las fluctuaciones cuadráticas medias (*Root Mean Square Fluctuation*, RMSF) de los átomos del receptor Ca y los diagramas de caja se calcularon durante los últimos 300 ns de las trayectorias de cMD. El ángulo entre dos hélices α se calculó utilizando un vector para cada hélice. El vector de una hélice α se define por dos puntos determinados por el centro de masa de cuatro átomos de Ca. Se eligieron los residuos 568-571 y 576-579 para los puntos inicial y final del vector H3B, residuos 712-715 y 718-721 para los puntos inicial y final del vector H10, y residuos 751-754 y 761-764 para los puntos inicial y final del vector H12. Las representaciones gráficas de las hélices α se obtuvieron con Bendix (Dahl, Chavent and Sansom, 2012). Los gráficos de Ramachandran se obtuvieron con el servidor RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003).

6.1.2. Complejos DBD/ADN

6.1.2.1. Estructuras iniciales del DBD/ADN. Para las simulaciones MD se prepararon cuatro sistemas SR-DBD/SR-DBD/DNA. La secuencia y coordenadas de DNA para todos los casos fue tomada del PDB ID:2c7a, del complejo PR-DBD/PR-DBD/DNA. Luego, se reemplazó la cadena A, B o ambas de PR-DBD por la de GR-DBD (PDB ID:3g6p), obteniendo los dímeros de DBD GR-GR, GR-PR, PR-GR y PR-PR. El estado de protonación de los residuos His se evaluó utilizando el servidor H++ (Anandakrishnan, Aguilar and Onufriev, 2012), observándose que todas las histidinas se encuentran protonadas en ϵ , con una carga neta igual a cero.

6.1.2.2. Simulación de dinámica molecular clásica de DBD/ADN. La dinámica molecular se realizó con el paquete de software AMBER 18. Los parámetros del ligando se asignaron de acuerdo con el campo de fuerza general AMBER (GAFF) y las cargas RESP correspondientes utilizando Antechamber. Los parámetros del campo de fuerza

FF14SB se usaron para los residuos del receptor, DNA.OL15 y el campo de fuerza optimizado para dedos de zinc de 4 residuos ZAFF (Peters *et al.*, 2010) para el ADN. Los complejos se sumergieron en una caja octaédrica de moléculas de agua TIP3P utilizando el módulo Tleap. Los sistemas se optimizaron inicialmente y luego se calentaron gradualmente hasta una temperatura final de 300 K. Todas las corridas de producción de MD de 500 ns se realizaron a 300 K en un conjunto NPT utilizando condiciones de contorno periódicas y el método Ewald de malla de partículas (espaciado de rejilla de 1 Å) para el tratamiento de interacciones electrostáticas de largo alcance con un plasma neutralizante uniforme. La regulación de la temperatura se realizó utilizando un termostato Langevin con una frecuencia de colisión de 2 ps⁻¹. El algoritmo SHAKE se usó para mantener los enlaces que involucran átomos de H en su longitud de equilibrio, lo que permitió el uso de un paso de tiempo de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton.

6.1.2.3. Análisis de resultados. Las trayectorias se analizaron con CPPTRAJ (Roe and Cheatham, 2013) y las instantáneas representativas se visualizaron con VMD (Humphrey, Dalke and Schulten, 1996). Las fluctuaciones cuadráticas medias (*Root Mean Square Fluctuation*, RMSF) de los átomos Cα del receptor se calcularon durante los últimos 300 ns de las trayectorias de cMD. Las distancias entre los residuos His453 y Tyr478 se calcularon tomando el centro de masa de los anillos aromáticos. Las distancias entre los residuos His453 y Cys478 se calcularon desde el átomo ND de la His453 hasta el átomo de azufre de la cadena lateral de la Cys478. La agrupación de trayectorias en *clusters* se realizó mediante el algoritmo de *clusterización* DBSCAN usando el RMSD como parámetro.

6.1.3. Docking péptido-proteína. Se utilizó el protocolo de refinamiento FlexPepDock del programa de libre acceso Rosetta (Raveh, London and Schueler-Furman, 2010). FlexPepDock optimiza iterativamente el esqueleto carbonado y la orientación del cuerpo rígido del péptido en relación con la proteína receptora, sumado a la optimización de las cadenas laterales “sobre la marcha”, es decir durante la ejecución

del programa sin interrumpir el proceso. Los archivos de estructuras iniciales se crearon a partir del PDB ID: 1m2z (cadena A) para el GR LBD y el coactivador TIF2. Las coordenadas de TIF2 se utilizaron luego como molde o *template* para generar las estructuras de los péptidos correguladores. Se obtuvieron 1000 soluciones para cada péptido y se seleccionó aquella con energía más favorable como valor de energía de interacción.

6.2. Métodos Experimentales

6.2.1. Reactivos utilizados

6.2.1.1. Agonistas del GR y del PR. Dexametasona (DEX) (Cat. D4902), RU486 (Cat. M8046) y R5020 (Cat. P0130) fueron adquiridos en Sigma (St Louis, MO, USA). Estas sustancias se disolvieron en etanol absoluto (Merck) y para todos los ensayos se prepararon soluciones 1000X que fueron almacenadas a -20°C. 21-hidroxi-6,19-oxiprogesterona (21OH-6,19OP) (Vicent *et al.*, 1997) y 21-hemisuccinoiloxi-6,19-oxiprogesterona (21HS-6,19OP) (Alvarez, Martí, Veleiro, Misico, *et al.*, 2008) fueron gentilmente proporcionados por el Dr. G. Burton (UMYMFOR-UBA-CONICET).

6.2.1.2. Medios de cultivo celulares. El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cat. 12800017), Opti-MEM (CAT 31985070) Gibco, el antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomicina) (Cat. 25200-072) y la tripsina (Cat. A40009) fueron adquiridos en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El suero fetal bovino (SFB) en Internegocios S.A. (Mercedes, Argentina). El antibiótico tetraciclina fue adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU) por el laboratorio del Dr. Presman.

6.2.1.3. Suero delipidado. El SFB libre de esteroides se preparó de acuerdo con lo descrito previamente (Lippman, Bolan and Huff, 1976). Brevemente, 10 ml de una solución 10X Carbón Dextrano (2,5% p/v de carbón activado (Sigma); 0,25% dextrano

(Sigma) en 0,01 M Tris-HCl, pH 7.4) se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 50 ml de suero fetal bovino y luego se incubó a 56 °C durante 30 minutos con leve agitación. Seguidamente se centrifugó y se repitió este procedimiento con un nuevo precipitado de Carbón-Dextrano. Finalmente, el suero resultante se filtró primero con un filtro de 0,45 µm y luego con un filtro de 0,2 µm.

6.2.1.4. Polietilenimina (PEI). Se preparó polietilenimina (PEI) (PEI lineal de 25 kDa, Polysciences, Inc., Cat. 23966) como solución madre a una concentración de 1 mg/ml en un *buffer* que contenía HEPES 25 mM y NaCl 150 mM (pH 7,5). El PEI se agregó al *buffer* y se agitó en vórtex hasta su completa disolución. Luego, se esterilizó por filtración con un filtro de jeringa de 0,22 µm, se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C hasta su uso.

6.2.1.5. Jet PRIME. El buffer y reactivo de transfección JetPrime (Polyplus-Transfection SA, Cat. 101000046) fueron gentilmente provistos por el laboratorio del Dr. Presman.

6.2.1.6. Kit Luciferase Assay System. El kit para la lisis celular y su reacción con la enzima luciferasa fue obtenido de Promega (Cat. E1501). El reactivo liofilizado se disolvió en el buffer provisto según indicaciones del fabricante, se alicuotó y se guardó a -80°C hasta su utilización.

6.2.1.7. Sonda Janelia Fluor JF549. El ligando Janelia Fluor® para la caracterización de fusiones HaloTag® fue adquirido en Promega (Cat. GA1110).

6.2.2. Plásmidos utilizados

pFlag-hGRα: vector de expresión del gen GR-α humano clonado en el vector pCMV-Tag 2 (Stratagene; Agilent Technologies, Inc.). Cedido gentilmente por la Dra. Rocha-Viegas (IFIByNE, UBA-CONICET).

pEGFP-hPRb: vector de expresión del gen PR-B humano clonado en el vector pEGFP-N3 (Clontech Laboratories, Inc.) Gentilmente cedido por Carol Lange, Department of

Medicine and Pharmacology, University of Minnesota Masonic Cancer Center, Minneapolis, USA (Diep et al, 2013).

pEGFP-mGR: vector de expresión de EGFP fusionado al extremo N-terminal del GR de ratón. Posee resistencia bacteriana a kanamicina. Cedido gentilmente por el Dr. Galigniana (IByME-CONICET, FCEN-UBA) (Presman et al, 2014).

pHalo-hPR-b: vector de expresión del gen PR-B humano clonado en el vector que contiene el constructo HaloTag (Promega). Cedido gentilmente por el Dr. Presman (IFIByNE, UBA-CONICET).

pMMTV-LUC: vector reportero que contiene el gen de luciferasa bajo el control del promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) que contiene elementos HRE.

pTAT4-HRE-Luc: vector reportero que contiene 4 copias del HRE del gen tirosina aminotransferasa subclonado río arriba de un promotor mínimo de *Drosophila* alcohol deshidrogenasa y el gen de luciferasa. Cedido gentilmente por la Dra. Liberman (CEBBAD-UMAI).

pTK2-HRE-Luc: vector reportero inducible por glucocorticoides que contiene un promotor mínimo y dos sitios HRE. Cedido gentilmente por la Dra. Liberman (CEBBAD-UMAI).

p2C7A-HRE-Luc: vector reportero con la secuencia AGAACAgttTGTTCT subclonada en el vector PGL3-promoter (Gene Universal Inc., Newark, DE).

pFKBP5-HRE-Luc: vector reportero con la secuencia AGAACaccTGTTCT subclonado en el vector PGL3-promoter (Gene Universal Inc., Newark, DE).

pRSV-LacZ1: vector que contiene el gen de b-galactosidasa bajo el promotor del virus de sarcoma de Roux (RSV) (Clontech Inc., Palo Alto, CA).

6.2.3. Preparación de plásmidos a gran escala

6.2.3.1. Preparación de bacterias competentes

Este procedimiento es llevado a cabo por el Lic. Clemente en IFIByNE-UBA-CONICET. Bacterias de la especie *Escherichia coli*, cepa DH5 α fueron cultivadas en medio LB (10 g/l peptona; 5 g/l Extracto de levadura; 5 g/l NaCl) 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 minutos a 0°C y se centrifugó por 10 minutos a 3000g a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 40 ml de TFB I: 30 mM Acetato de potasio; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15% Glicerol; pH 5.2. Se dejó en hielo por 5 minutos y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 3000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 4 ml de TFB II: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15% Glicerol; pH 6.5. A continuación, se dejó reposar las células en hielo durante 15 minutos para luego guardarlas a -70°C en alícuotas de 200 µl. Las bacterias se utilizaron a partir de las 48 horas de haber realizado este procedimiento.

6.2.3.2. Transformación de bacterias competentes

Con 1 µl de cada plásmido a amplificar, se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5α mediante shock térmico a 42 °C durante 90 segundos. A continuación, 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, de agar-LB (LB + 15 g/L de Agar) con ampicilina (100 µg/ml) o con kanamicina (100 µg/ml), dependiendo del tipo de resistencia del plásmido. Las placas fueron puestas en estufa a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se picaron algunas colonias y se realizaron minicultivos en LB conteniendo el correspondiente antibiótico a 37°C durante 16 horas, en agitación permanente.

6.2.3.3. Preparación de plásmidos

Este procedimiento es llevado a cabo por la Dra. Avendaño en IFIByNE-UBA-CONICET. Los minicultivos obtenidos fueron luego cultivados durante 24 horas en 400 ml de medio TB (1.33% Peptona; 2.675% extracto de lavadura; 0.4% Glicerol; 0.26% KH₂PO₄; 1.39% K₂HPO₄) con el correspondiente antibiótico (Ampicilina 100 µg/ml o Kanamicina 100 µg/ml). Se centrifugaron las bacterias 15 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las bacterias fueron resuspendidas en 10 ml de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8), se agitaron durante 5 minutos y se les agregó 20 ml de Solución II (0.2 M NaOH; 1% SDS). Luego se mezcló por inversión y se dejó a 0°C por 20

minutos. Posteriormente se colocaron 15 ml de Solución III (3 M Acetato de potasio; 11.5% Acético glacial pH=5.2), se mezcló por inversión por 5 minutos a 0°C, y se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C. Al sobrenadante se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló, y dejó 20 min a -20°C. Se centrifugó 1 hora a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 3 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA), se agregó igual volumen de LiCl 5 M (frío), se mezcló y centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos en frío. Se colectó el sobrenadante, se le agregó igual volumen de isopropanol, se mezcló y centrifugó 5 min a 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó, el pellet fue resuspendido en 0.5 ml de TE y se agregó 1 µl de ARNsa A 20 mg/ml incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó igual volumen de 13% polietilenglicol (PEG) en 1.6M NaCl, se mezcló y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 400 µl de TE. Se realizaron extracciones con 1 volumen de fenol saturado en Tris EDTA (TE) (una vez), 1 volumen fenol (saturado en TE): cloroformo (1:1) (2 veces), y 1 volumen cloroformo (una vez). Se agregó 0.1 volumen de Acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol (ETOH) 100 %. Se dejó 20 min a -20°C. Por último, se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm, se lavó con 70 % ETOH y se resuspendió el pellet en 200-500 µl de TE. La concentración de ADN obtenida se calculó como $(\mu\text{g de ADN}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{F dil}/1000$. La concentración de ADN se determinó utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

6.2.4. Líneas celulares

HEK-293-T: línea derivada de células embrionarias de riñón humano, cultivada en medio DMEM suplementado con 10% SFB y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco).

T47D-A1/2: línea celular derivada de la línea T47D-wt, a la cual se le expresó en forma estable el GR de rata (Nordeen et al, 1989). Dichas células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % SFB y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco).

D4-GR-KO: Células derivadas de la línea 3134, que tiene incorporado en su genoma un cassette génico en tándem de aproximadamente 200 copias que contiene el promotor

MMTV y el gen Ha-Ras (Walker, Htun and Hager, 1999). Luego, se modificó para expresar GFP-GR bajo el control de un promotor reprimible por tetraciclina, obteniendo la línea celular 3617 (McNally *et al.*, 2000) Finalmente, la línea 3617 se modificó utilizando CRISPR/Cas9 para eliminar la expresión endógena de GR y GFP-GR (Paakinaho *et al.*, 2019). Se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% SFB, 5 µg/ml tetraciclina (Sigma-Aldrich) y 100µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco).

Todas las líneas fueron crecidas a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 5 % CO₂.

6.2.5. Tratamientos en las líneas celulares

La dexametasona y R5020 se utilizaron en concentraciones finales de 10⁻⁸ M o según se indica. Los controles se realizaron agregando solo el vehículo al medio de incubación. En todos los casos, los tratamientos fueron asignados al azar a cada placa de células, y cada tratamiento se realizó por duplicado (réplicas independientes).

6.2.6. Transfecciones transitorias

6.2.6.1. Transfecciones con polietilenimina (PEI)

Las células HEK-293T fueron transfectadas en forma transitoria empleando en agente de transfección polietilenimina (Polysciences, Inc.) según el siguiente protocolo: cuando las células alcanzaron 70 - 90% de confluencia, se tripsinizaron con 1 ml de tripsina 0.25% (Hyclone), se resuspendieron en 5 mL de DMEM con 10% SFB, se contaron en una cámara de Neubauer y se sembraron 100.000 células por *well* por placa p12 en un volumen final de 700µl de DMEM con 10% de SFB. Se dejaron en incubación por 36 h. Una hora antes de la transfección se cambió el medio por 320µl de DMEM sin suero ni antibióticos y se dejaron en incubación. Luego, se preparó la mezcla de transfección de la siguiente forma: en un tubo Eppendorf se colocó NaCl 0.15M junto con el ADN a transfectar; en otro, el medio de cultivo Opti-MEM junto con la PEI. Luego de 5 minutos, se mezcló el contenido de ambos tubos, se dejó reposar 25 minutos a temperatura ambiente y se agregó gota a gota 30µl de la mezcla a cada *well*. Las células se incubaron 3.5 h, se reemplazó el medio por 500µl de DMEM con 2% de SFB delipidado, se aplicaron los tratamientos correspondientes y se incubaron nuevamente por 18 h. Finalmente, las

células fueron lisadas para determinar la actividad de Luciferasa y β -galactosidasa como se indica en la sección **6.2.6.3**.

6.2.6.2. Transfecciones con JetPRIME

Las células D4-GR-KO fueron transfectadas de la siguiente manera: las células tripsinizadas se resuspendieron en 5 mL de DMEM con 10% SFB, 1% penicilina-estreptomicina y 5 μ g/ml tetraciclina, se contaron en una cámara de Neubauer y se sembraron 200.000 células sobre un vidrio estéril de 25mm en una placa p35 con un volumen final de 2mL de DMEM con 10% SFB, 1% penicilina-estreptomicina y 5 μ g/ml tetraciclina. Luego de 24 h de incubación, se quitó 1mL de medio y se preparó la mezcla de transfección de la siguiente manera: para cada condición de transfección, se colocaron en un tubo Eppendorf 200ul de buffer de transfección y el ADN, se mezcló suavemente y se agregó el reactivo JetPRIME en relación 3:1 reactivo-ADN. Se centrifugó por 10 segundos, se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se agregó gota a gota todo el contenido del tubo Eppendorf a la placa correspondiente. Se incubó por 4 h, se cambió el medio por 1.5 mL de DMEM sin rojo fenol, con 10% suero delipidado y 5 μ g/ml tetraciclina y se incubó por 18 hs. Finalmente, las células se trataron con Dex 10^{-8} M y/o R5020 10^{-8} M y a los 60 min se montaron las células en el microscopio con control de temperatura y CO₂, obteniéndose imágenes por microscopía hasta las ~3 horas de estímulo.

6.2.6.3. Incubación con sonda Janelia Fluor JF549

Se preparó una mezcla de 700 μ l de DMEM sin rojo fenol con 10% SFB delipidado, 5 μ g/ml tetraciclina y 1.4 μ l de solución de sonda Janelia Fluor JF549 25 μ M por placa p35 a tratar. Se aspiró el medio de las células transfectadas con pHalo-hPRb y se incubaron con esta preparación por 1 hora a 37°C con 5% CO₂, se aspiró el medio y se realizaron 4 lavados con DMEM sin rojo fenol. Finalmente, se agregó 1 mL de DMEM sin rojo fenol con 10% SFB delipidado y 5 μ g/ml tetraciclina, se las incubó por 1 hora y se estimuló como en el caso anterior.

6.2.6.4. Determinación de la actividad de Luciferasa

Luego de la aplicación de los tratamientos a las células transfectadas, las células HEK-293T y T47D-A1/2, fueron lavadas con PBS y lisadas con 130 µl de Buffer de Lisis (Cell Culture Lysis Reagent E153A, Promega). A continuación se trasvasaron los lisados a tubos Eppendorf, se centrifugaron 5 minutos a 13000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes. La determinación de los niveles de actividad de luciferasa se realizó utilizando el kit *Luciferase Assay System* (Promega, Cat. E1501); 40 µl del sobrenadante fueron incubados con 15 µl del Buffer de ensayo (Luciferase assay Buffer, Promega) en oscuridad parcial, y se cuantificó la actividad de luciferasa en un luminómetro (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific Inc.).

6.2.6.5. Determinación de la actividad de β -Galactosidasa

La detección de la actividad de la enzima β -Galactosidasa se realizó mediante un método colorimétrico (Ausubel *et al.*, 1994). A 5 µl de muestra (sobrenadante obtenido en el punto **6.2.6.4**) se le agregaron 110 µl de Buffer Z (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 0.27% β -Mercaptoetanol) junto a 25 µl de orto-nitro-fenil-galactopiranosido (4 mg/ml ONPG, Sigma) y se mantuvo a 30-35°C hasta observar la aparición de color amarillo. La reacción se detuvo (en todas las muestras al mismo tiempo) con 62 µl de Na₂CO₃ 1M y se determinó la absorbancia a 415 nm con un espectrofotómetro (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific Inc.). Cada muestra se determinó por duplicado. Como blanco de reacción se utilizó la solución de ensayo.

6.2.6.6. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Esta detección se realizó mediante un método colorimétrico (Bradford, 1976). A 200 µl de Solución de Bradford se le agregaron 5 µl de muestra (sobrenadante obtenido en el punto **6.2.6.4**). Se determinó la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific Inc.). Cada muestra se determinó por duplicado. Como blanco de reacción se utilizó la solución de ensayo.

6.2.7. Ensayo de microarreglo de péptidos MARCoNI (*Microarray Assay for Realtime Coregulator-Nuclear receptor Interaction*).

El ensayo se lleva a cabo en un *microarray* (PamChip®) que consta de 117 péptidos únicos derivados de correguladores, ubicados en un portador de óxido metálico poroso. Cada péptido contiene un motivo de unión a NR incluyendo secuencias LXXLL o LXXXIXXXL, derivadas de proteínas coactivadoras o correpresoras conocidas, respectivamente (Koppen, Houtman and Pijnenburg, 2009). En total, 67 proteínas están representadas por estos péptidos. El NR a estudiar se estimula y se transfiere a los *microarrays*, donde se incuba e hibrida con los péptidos inmovilizados. Las interacciones entre péptidos y NR se visualizan mediante marcación con anticuerpos fluorescentes y se detectan a través de una cámara integrada en el PamStation® (Desmet *et al.*, 2014). Este ensayo fue realizado por René Houtman (PamGene International, Países Bajos) como parte de un trabajo en colaboración con nuestro grupo, Onno C. Meijer (Leiden University Medical Center, Países Bajos) y Gerardo Burton (UMYMFOR-CONICET-UBA).

6.2.8. Estudios por microscopía de fluorescencia

Los experimentos de microscopía de fluorescencia se llevaron a cabo en colaboración con la Lic. Lafuente del laboratorio del Dr. Presman.

6.2.8.1. Estudios de Número y Brillo (N&B)

6.2.8.1.1. Obtención de las muestras biológicas.

Las células D4-GR-KO fueron cultivadas sobre cubreobjetos circulares y transfectadas como se indicó en la sección **6.2.6.2**. Luego, se colocó el cubreobjetos en la cámara de montaje, con 1 mL de medio DMEM sin rojo fenol con 10% SFB delipidado y 5 µg/ml tetraciclina y se la ubicó dentro de la incubadora para la observación.

6.2.8.1.2. Obtención de las imágenes por microscopía confocal.

Las imágenes se tomaron en las instalaciones del Centro Weber de Microscopía de Fluorescencia (CMA-MF), FCEN-UBA, en un microscopio confocal de barrido láser LSM 980 (Carl Zeiss, Inc.) equipado con una cámara incubadora. Se tomaron imágenes de las células desde 60 min hasta un máximo de 3 h después de la adición del estímulo. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite de 63× (NA= 1,4). Para la excitación de GFP, se utilizó un láser Argón multilineal ajustado a 488 nm, con una potencia de láser de 3 μ W. Para la excitación de JF549, se utilizó un láser de 543 nm, con una potencia de láser de 12.18 μ W. Ambas señales se separaron con un detector espectral con el canal verde ajustado en el rango 490-543 nm y el canal rojo en 606-694 nm. La fluorescencia se detectó con un detector GaAsP en modo de recuento de fotones (photon-counting detection). Una vez seleccionada la célula a analizar, se tomaron 120 imágenes (256x256 píxeles) secuenciales, con una velocidad de barrido de 8.19 μ s/píxel y un tamaño de píxel de 80nm. El tiempo entre imágenes fue de 1.26 s. El tiempo aproximado de toma de imágenes para cada célula es de 2.5 minutos. Se descartaron las 5 primeras para reducir el fotoblanqueo de imágenes en los resultados. En una sesión de trabajo (aproximadamente 8 horas) se pueden medir hasta tres condiciones.

6.2.8.1.3. Análisis de las imágenes y cálculo del Brillo.

Las imágenes fueron analizadas siguiendo el protocolo descrito en (Jiménez-Panizo *et al.*, 2022), usando el algoritmo N&B del programa "SIMFCS 2.0" (Global Dynamics). Con este programa se determina la intensidad media ($\langle I \rangle$) y la varianza (σ^2) de cada píxel a partir de los valores de intensidad obtenidos en cada una de las 120 imágenes secuenciales de cada célula. El brillo aparente (B) se calcula como el cociente entre σ^2 y $\langle I \rangle$ para cada píxel de la imagen mientras que el número aparente de partículas en movimiento corresponde al cociente entre $\langle I \rangle$ y B (**Ecuaciones 4.1 a 4.3**). La salida de datos del programa es un histograma de los 65536 (256 x 256) píxeles de la imagen para B, es decir, el número de píxeles que presentan un determinado brillo aparente. Seleccionando el *cluster* de píxeles a analizar (en nuestro caso el núcleo o el array MMTV), y mediante la obtención del histograma para ese *cluster*, se puede calcular el

brillo aparente medio para ese conjunto de píxeles. Esto se logra mediante la aproximación de los datos a una distribución normal de Gauss, y fue realizado con la función Solver del programa Excel® 2000. Digman et al. demostraron que B es igual al brillo real (ϵ) de las partículas más uno (Digman *et al.*, 2008). Por lo tanto, el valor del brillo ϵ en cada píxel de las imágenes se puede extraer fácilmente de las medidas B. Es importante destacar que este análisis sólo proporciona información sobre las moléculas fluorescentes en movimiento o fluctuantes, ya que las moléculas fijas (en relación con nuestro marco de tiempo) darán valores de B iguales a 1. Los experimentos se repitieron de forma independiente dos veces para cada tratamiento/condición y se analizaron al menos 15 células por tratamiento.

6.2.8.2. Estudios de Correlación Cruzada de Brillo (Bcc)

El estudio de dos moléculas A y B cuya emisión de fluorescencia pueda ser discriminada entre sí, permite combinar la información proveniente de la serie temporal de imágenes en los dos canales para analizar si dichas moléculas forman parte de un hetero-complejo o si se mueven de manera independiente. Para ello, se debe determinar un parámetro adicional denominado correlación cruzada de brillo (*Cross-Correlation Brightness*, Bcc) (Digman *et al.*, 2009). La misma se obtiene a partir de la covarianza de intensidades entre ambos canales (σ_{cc}^2) normalizada respecto a la intensidad promedio de ambos canales y se la define como:

$$B_{cc} = \frac{\sigma_{cc}^2}{\sqrt{\langle I_G \rangle \langle I_R \rangle}} \quad \text{Ec. (4)}$$

Este tipo de análisis se puede realizar para todos los píxeles que conforman una región de interés. Al representar los valores de Bcc obtenidos para el conjunto de píxeles en un histograma, se puede evaluar estadísticamente la formación de heterocomplejos. Si este histograma está centrado en cero ($B_{cc} = 0$), implica que las fluctuaciones de intensidad entre los dos canales son independientes, indicando la ausencia de interacción (**Figura 6.1**). Si existe una correlación positiva ($B_{cc} > 0$) implica que ambas

partículas están interactuando y podrían formar parte de un mismo complejo (Digman et al, 2009) (**Figura 6.1**).

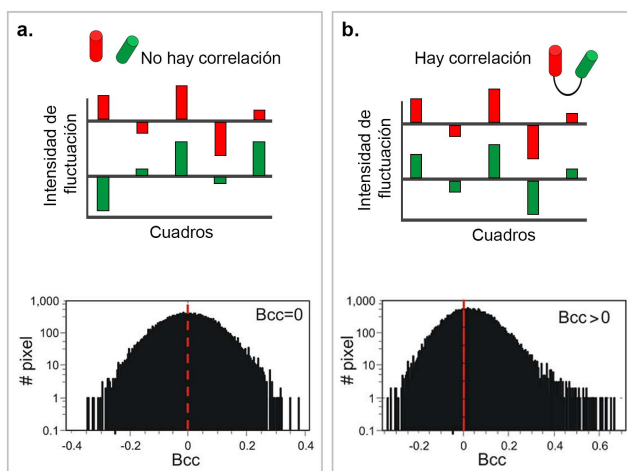


Figura 6.1 Análisis de correlación cruzada de brillo (Bcc). Distribución de los valores de Bcc de cada pixel **a.** cuando no hay interacción **b.** cuando existe interacción. Adaptado de (Presman et al., 2014)

6.2.8.2.1. Condiciones de adquisición de Bcc

El análisis de Bcc se realizó con los mismos datos obtenidos de N&B, descrito en el punto 6.2.8.2. El valor de Bcc se determinó siguiendo los procedimientos descritos por Digman (Digman and Gratton, 2009; Digman et al., 2009) para cada píxel correspondiente al núcleo.

6.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA.

6.4. Generación de imágenes.

Las imágenes originales fueron generadas en BioRender.com y Adobe Photoshop versión CS6 para Windows. Las imágenes modificadas de otras fuentes fueron editadas con Adobe Photoshop versión CS6 para Windows. Las imágenes correspondientes a estructuras cristalográficas y dinámicas moleculares fueron generadas con la función *render* de VMD.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Agresti, A. *et al.* (2005) 'GR and HMGB1 interact only within chromatin and influence each other's residence time', *Molecular cell*, 18(1), pp. 109–121.
- Alam, N. *et al.* (2017) 'High-resolution global peptide-protein docking using fragments-based PIPER-FlexPepDock', *PLoS computational biology*, 13(12), p. e1005905.
- Alvarez, L.D., Martí, M.A., Veleiro, A.S., Presman, D.M., *et al.* (2008) 'Exploring the molecular basis of action of the passive antiglucocorticoid 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone', *Journal of medicinal chemistry*, 51(5), pp. 1352–1360.
- Alvarez, L.D., Martí, M.A., Veleiro, A.S., Misico, R.I., *et al.* (2008) 'Hemisuccinate of 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone: a tissue-specific modulator of the glucocorticoid receptor', *ChemMedChem*, 3(12), pp. 1869–1877.
- Alvarez, L.D. *et al.* (2020) 'Cholestenoic acid analogues as inverse agonists of the liver X receptors', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 199, p. 105585.
- Álvarez, L.D., Presman, D.M. and Pecci, A. (2017) '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), p. e0189588.
- Alves, N.R.C., Pecci, A. and Alvarez, L.D. (2020) 'Structural Insights into the Ligand Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor: A Molecular Dynamics Study', *Journal of chemical information and modeling*, 60(2), pp. 794–804.
- Anandakrishnan, R., Aguilar, B. and Onufriev, A.V. (2012) 'H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations', *Nucleic acids research*, 40(Web Server issue), pp. W537–41.
- Archer, T.K. *et al.* (1994) 'The differential capacity of glucocorticoids and progestins to alter chromatin structure and induce gene expression in human breast cancer cells', *Molecular endocrinology*, 8(9), pp. 1154–1162.
- Ausubel, F.M. *et al.* (1994) 'Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Willey & Sons'. Inc.
- Bagherpoor Helabad, M., Volkenandt, S. and Imhof, P. (2020) 'Molecular Dynamics Simulations of a Chimeric Androgen Receptor Protein (SPARKI) Confirm the Importance of the Dimerization Domain on DNA Binding Specificity', *Frontiers in molecular biosciences*, 7, p. 4.
- Bai Chang, Schmidt Azriel, Freedman Leonard P (2003) 'Steroid Hormone Receptors and Drug Discovery: Therapeutic Opportunities and Assay Designs', *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1(6), pp. 843–852.

- Batista, M.R.B. and Martínez, L. (2013) 'Dynamics of nuclear receptor Helix-12 switch of transcription activation by modeling time-resolved fluorescence anisotropy decays', *Biophysical journal*, 105(7), pp. 1670–1680.
- Beck, I.M., De Bosscher, K. and Haegeman, G. (2011) 'Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 22(8), pp. 295–310.
- Beekmann, K. *et al.* (2015) 'The effect of glucuronidation on isoflavone induced estrogen receptor (ER) α and ER β mediated coregulator interactions', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 154, pp. 245–253.
- Bernardi, R.C., Melo, M.C.R. and Schulten, K. (2015) 'Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems', *Biochimica et biophysica acta*, 1850(5), pp. 872–877.
- Birth, P. *et al.* (2017) 'Identification and characterization of BATF3 as a context-specific coactivator of the glucocorticoid receptor', *PloS one*, 12(7), p. e0181219.
- Bledsoe, R.K. *et al.* (2002) 'Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition', *Cell*, 110(1), pp. 93–105.
- Bledsoe, R.K., Stewart, E.L. and Pearce, K.H. (2004) 'Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain', *Vitamins and hormones*, 68, pp. 49–91.
- Bradford, M.M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical biochemistry*, 72(1), pp. 248–254.
- Brust, R. *et al.* (2018) 'A structural mechanism for directing corepressor-selective inverse agonism of PPAR γ ', *Nature communications*, 9(1), p. 4687.
- Butz, H. and Patócs, A. (2022) 'Mechanisms behind context-dependent role of glucocorticoids in breast cancer progression', *Cancer metastasis reviews*, 41(4), pp. 803–832.
- Cain, D.W. and Cidlowski, J.A. (2015) 'Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease', *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 29(4), pp. 545–556.
- Carceller-Zazo, E. *et al.* (2023) 'The mineralocorticoid receptor modulates timing and location of genomic binding by glucocorticoid receptor in response to synthetic glucocorticoids in keratinocytes', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 37(1), p. e22709.

- Chrisman, I.M. *et al.* (2018) 'Defining a conformational ensemble that directs activation of PPAR γ ', *Nature communications*, 9(1), p. 1794.
- Chrousos, G.P. (1995) 'The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation', *The New England journal of medicine*, 332(20), pp. 1351–1362.
- Clarisse, D. *et al.* (2017) 'Coregulator profiling of the glucocorticoid receptor in lymphoid malignancies', *Oncotarget*, 8(65), pp. 109675–109691.
- Clark, A.R. (2007) 'Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes', *Molecular and cellular endocrinology*, 275(1-2), pp. 79–97.
- Clark, A.R. and Belvisi, M.G. (2012) 'Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor', *Pharmacology & therapeutics*, 134(1), pp. 54–67.
- Cole, T.J., Short, K.L. and Hooper, S.B. (2019) 'The science of steroids', *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 24(3), pp. 170–175.
- Coutinho, A.E. and Chapman, K.E. (2011) 'The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights', *Molecular and cellular endocrinology*, 335(1), pp. 2–13.
- Coutsias, E.A., Seok, C. and Dill, K.A. (2004) 'Using quaternions to calculate RMSD', *Journal of computational chemistry*, 25(15), pp. 1849–1857.
- Crooks, G.E. *et al.* (2004) 'WebLogo: A Sequence Logo Generator: Figure 1', *Genome Research*, pp. 1188–1190. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.849004>.
- Dahl, A.C.E., Chavent, M. and Sansom, M.S.P. (2012) 'Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction', *Bioinformatics*, 28(16), pp. 2193–2194.
- De Bosscher, K. *et al.* (2008) 'Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems', *European journal of pharmacology*, 583(2-3), pp. 290–302.
- Derendorf, H. *et al.* (1993) 'Receptor-based pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of corticosteroids', *Journal of clinical pharmacology*, 33(2), pp. 115–123.
- Desmet, S.J. *et al.* (2014) 'Cofactor Profiling of the Glucocorticoid Receptor from a Cellular Environment', in G. Castoria and F. Auricchio (eds) *Steroid Receptors: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, pp. 83–94.
- Digman, M.A. *et al.* (2008) 'Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope', *Biophysical journal*, 94(6), pp. 2320–2332.

Digman, M.A. *et al.* (2009) 'Stoichiometry of molecular complexes at adhesions in living cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), pp. 2170–2175.

Digman, M.A. and Gratton, E. (2009) 'Imaging barriers to diffusion by pair correlation functions', *Biophysical journal*, 97(2), pp. 665–673.

Do, P.-C., Lee, E.H. and Le, L. (2018) 'Steered Molecular Dynamics Simulation in Rational Drug Design', *Journal of chemical information and modeling*, 58(8), pp. 1473–1482.

Duan, M. *et al.* (2016) 'Structural Diversity of Ligand-Binding Androgen Receptors Revealed by Microsecond Long Molecular Dynamics Simulations and Enhanced Sampling', *Journal of chemical theory and computation*, 12(9), pp. 4611–4619.

Duma, D. and Cidlowski, J.A. (2010) 'Generating diversity in glucocorticoid receptor signaling: mechanisms, receptor isoforms, and post-translational modifications', *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 3(1), pp. 319–328.

Edman, K. *et al.* (2015) 'Ligand Binding Mechanism in Steroid Receptors: From Conserved Plasticity to Differential Evolutionary Constraints', *Structure*, 23(12), pp. 2280–2290.

Evans, R.M. (2005) 'The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology', *Molecular endocrinology*, 19(6), pp. 1429–1438.

Frisch, A. and Others (2009) 'gaussian 09W Reference', *Wallingford, USA*, 25p, 470. Available at: https://www.cwu.edu/chemistry/sites/cts.cwu.edu.chemistry/files/documents/Gaussian_09_ReferenceManual.pdf.

Galigniana, N.M. *et al.* (2012) 'Regulation of the glucocorticoid response to stress-related disorders by the Hsp90-binding immunophilin FKBP51', *Journal of neurochemistry*, 122(1), pp. 4–18.

Gampe, R.T., Jr *et al.* (2000) 'Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by tetramer formation and the AF-2 helix', *Genes & development*, 14(17), pp. 2229–2241.

Gebhardt, J.C.M. *et al.* (2013) 'Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells', *Nature methods*, 10(5), pp. 421–426.

Gerber, A.N., Newton, R. and Sasse, S.K. (2021) 'Repression of transcription by the glucocorticoid receptor: A parsimonious model for the genomics era', *The Journal of biological chemistry*, 296, p. 100687.

Goya, L. *et al.* (1993) 'Glucocorticoids induce a G1/G0 cell cycle arrest of Con8 rat mammary tumor cells that is synchronously reversed by steroid withdrawal or addition of transforming growth factor-alpha', *Molecular endocrinology*, 7(9), pp. 1121–1132.

Granner, D.K., Wang, J.-C. and Yamamoto, K.R. (2015) 'Regulatory Actions of Glucocorticoid Hormones: From Organisms to Mechanisms', *Advances in experimental medicine and biology*, 872, pp. 3–31.

Griekspoor, A. *et al.* (2007) 'Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells', *Nuclear receptor signaling*, 5, p. e003.

Groner, B., Altiok, S. and Meier, V. (1994) 'Hormonal regulation of transcription factor activity in mammary epithelial cells', *Molecular and cellular endocrinology*, 100(1-2), pp. 109–114.

Hartmann, K. *et al.* (2016) 'Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy', *Physiological Reviews*, pp. 409–447. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2015>.

Heck, S. *et al.* (1994) 'A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1', *The EMBO journal*, 13(17), pp. 4087–4095.

Hegde, S.M. *et al.* (2016) 'Interplay of nuclear receptors (ER, PR, and GR) and their steroid hormones in MCF-7 cells', *Molecular and cellular biochemistry*, 422(1-2), pp. 109–120.

Hench, P.S. and Kendall, E.C. (1949) 'The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis', *Proceedings of the staff meetings. Mayo Clinic*, 24(8), pp. 181–197.

Hessenkemper, W. and Baniahmad, A. (2012) 'Chaperones for proper androgen action - a plethora of assistance to androgen receptor function', *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 11(1), pp. 321–328.

Hollingsworth, S.A. and Dror, R.O. (2018) 'Molecular Dynamics Simulation for All', *Neuron*, 99(6), pp. 1129–1143.

Hopkins, A.L., Mason, J.S. and Overington, J.P. (2006) 'Can we rationally design promiscuous drugs?', *Current opinion in structural biology*, 16(1), pp. 127–136.

Horwitz, K.B. (1992) 'The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer?', *Endocrine reviews*, 13(2), pp. 146–163.

Hübner, S. *et al.* (2015) 'The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough', *Biological chemistry*, 396(11), pp. 1223–1231.

Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) 'VMD: visual molecular dynamics', *Journal of molecular graphics*, 14(1), pp. 33–8, 27–8.

Hu, X. *et al.* (2022) 'Discovery of Novel GR Ligands toward Druggable GR Antagonist Conformations Identified by MD Simulations and Markov State Model Analysis', *Advancement of science*, 9(3), p. e2102435.

Jewell, C.M. *et al.* (2012) 'Complex human glucocorticoid receptor dim mutations define glucocorticoid induced apoptotic resistance in bone cells', *Molecular endocrinology*, 26(2), pp. 244–256.

Jiménez-Panizo, A. *et al.* (2022) 'The multivalency of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain explains its manifold physiological activities', *Nucleic acids research*, 50(22), pp. 13063–13082.

Jin, Y. *et al.* (2019) 'Communication between the Ligand-Binding Pocket and the Activation Function-2 Domain of Androgen Receptor Revealed by Molecular Dynamics Simulations', *Journal of chemical information and modeling*, 59(2), pp. 842–857.

Johnson, T.A. *et al.* (2021) 'Genome-wide binding potential and regulatory activity of the glucocorticoid receptor's monomeric and dimeric forms', *Nature communications*, 12(1), p. 1987.

Jordan, V.C., Craig Jordan, V. and O'Malley, B.W. (2007) 'Selective Estrogen-Receptor Modulators and Antihormonal Resistance in Breast Cancer', *Journal of Clinical Oncology*, pp. 5815–5824. Available at: <https://doi.org/10.1200/jco.2007.11.3886>.

Kästner, J. (2011) 'Umbrella sampling', *Wiley interdisciplinary reviews. Computational molecular science*, 1(6), pp. 932–942.

Kästner, J. and Thiel, W. (2005) 'Bridging the gap between thermodynamic integration and umbrella sampling provides a novel analysis method: "Umbrella integration"', *The Journal of Chemical Physics*, p. 144104. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.2052648>.

Kauppi, B. *et al.* (2003) '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', *The Journal of biological chemistry*, 278(25), pp. 22748–22754.

Kirschke, E. *et al.* (2014) 'Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles', *Cell*, 157(7), pp. 1685–1697.

Kleiman, A. and Tuckermann, J.P. (2007) 'Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice', *Molecular and cellular endocrinology*, 275(1-2), pp. 98–108.

Köhler, C. *et al.* (2020) 'Dynamic allosteric communication pathway directing differential activation of the glucocorticoid receptor', *Science advances*, 6(29), p. eabb5277.

Kojetin, D.J. and Burris, T.P. (2013) 'Small molecule modulation of nuclear receptor conformational dynamics: implications for function and drug discovery', *Molecular pharmacology*, 83(1), pp. 1–8.

Koppen, A., Houtman, R. and Pijnenburg, D. (2009) 'Nuclear receptor-coregulator interaction profiling identifies TRIP3 as a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ cofactor', & *Cellular Proteomics* [Preprint]. Available at: [https://www.mcponline.org/article/S1535-9476\(20\)33946-3/abstract](https://www.mcponline.org/article/S1535-9476(20)33946-3/abstract).

Kumar, R. (2021) 'Role of conformational dynamics and flexibilities in the steroid receptor-coregulator protein complex formation', *General and comparative endocrinology*, 309, p. 113780.

Kurihara, I. *et al.* (2002) 'Expression and regulation of nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action', *Molecular and cellular endocrinology*, 189(1-2), pp. 181–189.

van der Laan, S. and Meijer, O.C. (2008) 'Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors', *European journal of pharmacology*, 585(2-3), pp. 483–491.

Lambert, J.R. and Nordeen, S.K. (2003) 'CBP recruitment and histone acetylation in differential gene induction by glucocorticoids and progestins', *Molecular endocrinology*, 17(6), pp. 1085–1094.

Larry Jameson, J. *et al.* (2018) *Harrison's Principles of Internal Medicine, Twentieth Edition (Vol.1 & Vol.2)*. McGraw-Hill Education / Medical.

La Sala, G. *et al.* (2021) 'Unraveling the Allosteric Cross-Talk between the Coactivator Peptide and the Ligand-Binding Site in the Glucocorticoid Receptor', *Journal of chemical information and modeling*, 61(7), pp. 3667–3680.

Le Billan, F. *et al.* (2018) 'Corticosteroid receptors adopt distinct cyclical transcriptional signatures', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(10), pp. 5626–5639.

Leo, J.C.L. *et al.* (2004) 'Glucocorticoid and mineralocorticoid cross-talk with progesterone receptor to induce focal adhesion and growth inhibition in breast cancer cells', *Endocrinology*, 145(3), pp. 1314–1321.

Lieberman, B.A. *et al.* (1993) 'The constitution of a progesterone response element', *Molecular endocrinology*, 7(4), pp. 515–527.

Lippman, M., Bolan, G. and Huff, K. (1976) 'The effects of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture', *Cancer research*, 36(12), pp. 4610–4618.

- Liu, T. *et al.* (2014) 'Subangstrom accuracy in pHLA-I modeling by Rosetta FlexPepDock refinement protocol', *Journal of chemical information and modeling*, 54(8), pp. 2233–2242.
- Liu, W. *et al.* (1995) 'Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), pp. 12480–12484.
- Li, X. *et al.* (2003) 'Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification', *Molecular and cellular biology*, 23(11), pp. 3763–3773.
- Li, Y. *et al.* (2018) 'Differential in Vitro Biological Action, Coregulator Interactions, and Molecular Dynamic Analysis of Bisphenol A (BPA), BPAF, and BPS Ligand-ER α Complexes', *Environmental health perspectives*, 126(1), p. 017012.
- Lonard, D.M. and O'Malley, B.W. (2005) 'Expanding functional diversity of the coactivators', *Trends in biochemical sciences*, 30(3), pp. 126–132.
- Lonard, D.M. and O'Malley, B.W. (2012) 'Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets', *Nature reviews. Endocrinology*, 8(10), pp. 598–604.
- Lovell, S.C. *et al.* (2003) 'Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation', *Proteins*, 50(3), pp. 437–450.
- Lu, N.Z. and Cidlowski, J.A. (2005) 'Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes', *Molecular cell*, 18(3), pp. 331–342.
- Mangelsdorf, D.J. *et al.* (1995) 'The nuclear receptor superfamily: the second decade', *Cell*, 83(6), pp. 835–839.
- Mason, H.L., Hoehn, W.M. and Kendall, E.C. (1938) 'Chemical studies of the suprarenal cortex', *The Journal of biological chemistry*, 124(2), pp. 459–474.
- Mason, H.L., Myers, C.S. and Kendall, E.C. (1936) 'Chemical studies of the suprarenal cortex', *The Journal of biological chemistry*, 116(1), pp. 267–276.
- Maximova, T. *et al.* (2016) 'Principles and Overview of Sampling Methods for Modeling Macromolecular Structure and Dynamics', *PLoS computational biology*, 12(4), p. e1004619.
- McNally, J.G. *et al.* (2000) 'The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells', *Science*, 287(5456), pp. 1262–1265.
- Medvedev, A. *et al.* (2022) 'Comprehensive assessment of NR ligand polypharmacology by a multiplex reporter NR assay', *Scientific reports*, 12(1), pp. 1–18.

Meijsing, S.H. *et al.* (2009) 'DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity', *Science*, 324(5925), pp. 407–410.

Melmed, S. *et al.* (2019) *Williams Textbook of Endocrinology E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Michel, D. (2016) 'Conformational selection or induced fit? New insights from old principles', *Biochimie*, 128-129, pp. 48–54.

Mifsud, K.R. and Reul, J.M.H.M. (2016) 'Acute stress enhances heterodimerization and binding of corticosteroid receptors at glucocorticoid target genes in the hippocampus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), pp. 11336–11341.

Morphy, R., Kay, C. and Rankovic, Z. (2004) 'From magic bullets to designed multiple ligands', *Drug discovery today*, 9(15), pp. 641–651.

Murphy, V.E. *et al.* (2006) 'Endocrine Regulation of Human Fetal Growth: The Role of the Mother, Placenta, and Fetus', *Endocrine reviews*, 27(2), pp. 141–169.

Nelson LR, B.S.E. (2001) 'Estrogen production and action', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(3), pp. S116–S124.

Ng, H.L. (2016) 'Simulations reveal increased fluctuations in estrogen receptor-alpha conformation upon antagonist binding', *Journal of molecular graphics & modelling*, 69, pp. 72–77.

Nicolaides, N.C. *et al.* (2010) 'The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function', *Steroids*, 75(1), pp. 1–12.

Nicolaides, N.C. and Charmandari, E. (2021) 'Primary Generalized Glucocorticoid Resistance and Hypersensitivity Syndromes: A 2021 Update', *International journal of molecular sciences*, 22(19), p. 10839.

Niculet, E., Bobeica, C. and Tatu, A.L. (2020) 'Glucocorticoid-Induced Skin Atrophy: The Old and the New', *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 13, pp. 1041–1050.

Nieuwenhuizen, A.G. and Rutters, F. (2008) 'The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance', *Physiology & Behavior*, pp. 169–177. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.12.011>.

Nishi, M. *et al.* (2004) 'Visualization of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor interactions in living cells with GFP-based fluorescence resonance energy transfer', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(21), pp. 4918–4927.

Noddings, C.M. *et al.* (2022) 'Structure of Hsp90-p23-GR reveals the Hsp90 client-remodelling mechanism', *Nature*, 601(7893), pp. 465–469.

Nordeen, S.K. *et al.* (1989) 'A quantitative comparison of dual control of a hormone response element by progestins and glucocorticoids in the same cell line', *Molecular endocrinology*, 3(8), pp. 1270–1278.

Oakley, R.H. *et al.* (2018) 'Glucocorticoid receptor isoform-specific regulation of development, circadian rhythm, and inflammation in mice', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(10), pp. 5258–5271.

Ogara, M.F. *et al.* (2019) 'The glucocorticoid receptor interferes with progesterone receptor-dependent genomic regulation in breast cancer cells', *Nucleic acids research*, 47(20), pp. 10645–10661.

Okafor, C.D. *et al.* (2020) 'Rewiring Ancient Residue Interaction Networks Drove the Evolution of Specificity in Steroid Receptors', *Structure*, 28(2), pp. 196–205.e3.

Oprea, A. *et al.* (2019) 'Novel insights into glucocorticoid replacement therapy for pediatric and adult adrenal insufficiency', *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 10, p. 2042018818821294.

Ou, X.M. *et al.* (2001) 'Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene', *The Journal of biological chemistry*, 276(17), pp. 14299–14307.

Paakinaho, V. *et al.* (2017) 'Single-molecule analysis of steroid receptor and cofactor action in living cells', *Nature communications*, 8, p. 15896.

Paakinaho, V. *et al.* (2019) 'Glucocorticoid receptor quaternary structure drives chromatin occupancy and transcriptional outcome', *Genome research*, 29(8), pp. 1223–1234.

Papadopoulos, J.S. and Agarwala, R. (2007) 'COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences', *Bioinformatics*, 23(9), pp. 1073–1079.

Patrick, K.S. (2002) 'Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Edition Edited by J. G. Hardman, L. E. Limbird, and A. G. Gilman. McGraw Hill, New York. 2001. xxvii 2148 pp. 21 × 26 cm. ISBN 0-07-1354469-7. \$125.00', *Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 1392–1393. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm020026w>.

Pawlina, W. and Ross, M. (2015) *Histologia: Texto y Atlas*. Lww.

Pecci, A. *et al.* (2009) 'New lead compounds in the search for pure antiglucocorticoids and the dissociation of antiglucocorticoid effects', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 113(3-5), pp. 155–162.

Pecci, A. *et al.* (2018) '21-Hydroxy-6,19-epoxyprogesterone: A Promising Therapeutic Agent and a Molecular Tool for Deciphering Glucocorticoid Action', *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(5), pp. 428–438.

Peters, M.B. *et al.* (2010) 'Structural Survey of Zinc-Containing Proteins and Development of the Zinc AMBER Force Field (ZAFF)', *Journal of chemical theory and computation*, 6(9), pp. 2935–2947.

Pooley, J.R. *et al.* (2020) 'Beyond the heterodimer model for mineralocorticoid and glucocorticoid receptor interactions in nuclei and at DNA', *PloS one*, 15(1), p. e0227520.

Pratt, W.B. *et al.* (2004) 'Role of molecular chaperones in steroid receptor action', *Essays in biochemistry*, 40, pp. 41–58.

Pratt, W.B. and Toft, D.O. (1997) 'Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones', *Endocrine reviews*, 18(3), pp. 306–360.

Presman, D.M. *et al.* (2010) 'Insights on glucocorticoid receptor activity modulation through the binding of rigid steroids', *PloS one*, 5(10), p. e13279.

Presman, D.M. *et al.* (2014) 'Live cell imaging unveils multiple domain requirements for in vivo dimerization of the glucocorticoid receptor', *PLoS biology*, 12(3), p. e1001813.

Presman, D.M. *et al.* (2016) 'DNA binding triggers tetramerization of the glucocorticoid receptor in live cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), pp. 8236–8241.

Proschak, E., Stark, H. and Merk, D. (2019) 'Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds', *Journal of medicinal chemistry*, 62(2), pp. 420–444.

Rastinejad, F. *et al.* (2013) 'Understanding nuclear receptor form and function using structural biology', *Journal of molecular endocrinology*, 51(3), pp. T1–T21.

Raveh, B., London, N. and Schueler-Furman, O. (2010) 'Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, pp. 2029–2040. Available at: <https://doi.org/10.1002/prot.22716>.

Reichardt, H.M. *et al.* (1998) 'DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival', *Cell*, 93(4), pp. 531–541.

Reichardt, H.M. *et al.* (2001) 'Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor', *The EMBO journal*, 20(24), pp. 7168–7173.

Reichstein, T. (1936) 'Über Bestandteile der Nebennieren-Rinde VI. Trennungsmethoden, sowie Isolierung der Substanzen F. a. H und J', *Helvetica chimica acta*, 19(1), pp. 1107–1126.

Reichstein, T. and Shoppee, C.W. (1943) 'The Hormones of the Adrenal Cortex', in R.S. Harris, K.V. Thimann, and E.V. McCollum (eds) *Vitamins & Hormones*. Academic Press, pp. 345–413.

Roe, D.R. and Cheatham, T.E., 3rd (2013) 'PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data', *Journal of chemical theory and computation*, 9(7), pp. 3084–3095.

Rogatsky, I. et al. (2003) 'Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp. 13845–13850.

Ronacher, K. et al. (2009) 'Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction', *Molecular and cellular endocrinology*, 299(2), pp. 219–231.

Rosen, J. and Miner, J.N. (2005) 'The search for safer glucocorticoid receptor ligands', *Endocrine reviews*, 26(3), pp. 452–464.

Rowan, B.G. and O'Malley, B.W. (2000) 'Progesterone receptor coactivators', *Steroids*, 65(10-11), pp. 545–549.

Savory, J.G. et al. (2001) 'Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces', *Molecular and cellular biology*, 21(3), pp. 781–793.

Schaaf, M.J.M., Lewis-Tuffin, L.J. and Cidlowski, J.A. (2005) 'Ligand-selective targeting of the glucocorticoid receptor to nuclear subdomains is associated with decreased receptor mobility', *Molecular endocrinology*, 19(6), pp. 1501–1515.

Schäcke, H., Döcke, W.D. and Asadullah, K. (2002) 'Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids', *Pharmacology & therapeutics*, 96(1), pp. 23–43.

Schoch, G.A. et al. (2010) 'Molecular switch in the glucocorticoid receptor: active and passive antagonist conformations', *Journal of molecular biology*, 395(3), pp. 568–577.

Shao, R. et al. (2006) 'Developmental and hormonal regulation of progesterone receptor A-form expression in female mouse lung in vivo: interaction with glucocorticoid receptors', *The Journal of endocrinology*, 190(3), pp. 857–870.

Shi, Y. et al. (2022) 'The Role of Conformational Dynamics and Allostery in the Control of Distinct Efficacies of Agonists to the Glucocorticoid Receptor', *Frontiers in molecular biosciences*, 9, p. 933676.

Skowron, K.J. *et al.* (2019) 'Steroid receptor/coactivator binding inhibitors: An update', *Molecular and cellular endocrinology*, 493, p. 110471.

Spitz, I.M. and Bardin, C.W. (1993) 'Clinical pharmacology of RU 486--an antiprogesterin and antiglucocorticoid', *Contraception*, 48(5), pp. 403–444.

Spyrakakis*, F., Barril*, X. and Javier Luque*, F. (2012) 'Molecular Dynamics: a Tool to Understand Nuclear Receptors', in.

Stallcup, M.R. and Poulard, C. (2020) 'Gene-Specific Actions of Transcriptional Coregulators Facilitate Physiological Plasticity: Evidence for a Physiological Coregulator Code', *Trends in biochemical sciences*, 45(6), pp. 497–510.

van Steensel, B. *et al.* (1995) 'Localization of the glucocorticoid receptor in discrete clusters in the cell nucleus', *Journal of cell science*, 108 (Pt 9)(9), pp. 3003–3011.

Stortz, M. *et al.* (2017) 'Mapping the Dynamics of the Glucocorticoid Receptor within the Nuclear Landscape', *Scientific reports*, 7(1), p. 6219.

Stortz, M. *et al.* (2020) 'Unraveling the molecular interactions involved in phase separation of glucocorticoid receptor', *BMC biology*, 18(1), p. 59.

Sun, Z. and Xu, Y. (2020) 'Nuclear Receptor Coactivators (NCOAs) and Corepressors (NCORs) in the Brain', *Endocrinology*, 161(8). Available at: <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa083>.

Suren, T. *et al.* (2018) 'Single-molecule force spectroscopy reveals folding steps associated with hormone binding and activation of the glucocorticoid receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(46), pp. 11688–11693.

Tao, L.J. *et al.* (2020) 'Nuclear Hormone Receptors and Their Ligands: Metabolites in Control of Transcription', *Cells*, 9(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9122606>.

de Terán Bleiberg, E. (2021) 'Actualización del Diccionario de términos médicos de la Real Academia Nacional de Medicina de España', *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, pp. 237–238. Available at: <https://doi.org/10.4321/s0376-78922021000300002>.

Thackray, V.G., Lieberman, B.A. and Nordeen, S.K. (1998) 'Differential gene induction by glucocorticoid and progesterone receptors', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 66(4), pp. 171–178.

Thau, L., Gandhi, J. and Sharma, S. (2022) 'Physiology, Cortisol', in *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1950 (no date) *NobelPrize.org*. Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1950/summary/> (Accessed: 18 June 2023).

- Thornton, J.W. (2001) 'Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), pp. 5671–5676.
- Thornton, J.W., Need, E. and Crews, D. (2003) 'Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling', *Science*, 301(5640), pp. 1714–1717.
- Tyagi, V. et al. (2017) 'Revisiting the role of testosterone: Are we missing something?', *Reviews in urology*, 19(1), pp. 16–24.
- Vandevyver, S. et al. (2013) 'New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation', *Endocrinology*, 154(3), pp. 993–1007.
- Veleiro, A.S. et al. (2010) 'Structure of the glucocorticoid receptor, a flexible protein that can adapt to different ligands', *ChemMedChem*, 5(5), pp. 649–659.
- Verouti, S., Hummler, E. and Vanderriele, P.-E. (2022) 'Role of glucocorticoid receptor mutations in hypertension and adrenal gland hyperplasia', *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 474(8), pp. 829–840.
- Vettorazzi, S. et al. (2022) 'A guide to changing paradigms of glucocorticoid receptor function-a model system for genome regulation and physiology', *The FEBS journal*, 289(19), pp. 5718–5743.
- Vicent, G.P. et al. (1997) '21-Hydroxy-6,19-oxidoprogesterone: a novel synthetic steroid with specific antiglucocorticoid properties in the rat', *Molecular pharmacology*, 52(4), pp. 749–753.
- Vitellius, G. et al. (2016) 'Three Novel Heterozygous Point Mutations of NR3C1 Causing Glucocorticoid Resistance', *Human mutation*, 37(8), pp. 794–803.
- Walker, D., Htun, H. and Hager, G.L. (1999) 'Using inducible vectors to study intracellular trafficking of GFP-tagged steroid/nuclear receptors in living cells', *Methods*, 19(3), pp. 386–393.
- Wang, R.Y.-R. et al. (2022) 'Structure of Hsp90-Hsp70-Hop-GR reveals the Hsp90 client-loading mechanism', *Nature*, 601(7893), pp. 460–464.
- Wan, Y. and Nordeen, S.K. (2002) 'Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestins in human breast cancer cells', *Molecular endocrinology*, 16(6), pp. 1204–1214.
- Watson, L.C. et al. (2013) 'The glucocorticoid receptor dimer interface allosterically transmits sequence-specific DNA signals', *Nature Structural & Molecular Biology*, pp. 876–883. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2595>.

Webb, B. and Sali, A. (2016) 'Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER', *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 54, pp. 5.6.1–5.6.37.

Weikum, E.R. *et al.* (2017) 'Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(3), pp. 159–174.

Weikum, E.R., Liu, X. and Ortlund, E.A. (2018) 'The nuclear receptor superfamily: A structural perspective', *Protein science: a publication of the Protein Society*, 27(11), pp. 1876–1892.

Westin, S., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (1999) 'Nuclear Receptor Coactivators', in E.J. McShane (ed.) *Advances in Pharmacology*. Academic Press, pp. 89–112.

Yoshinaga, S.K. *et al.* (1992) 'Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors', *Science*, 258(5088), pp. 1598–1604.

Zheng, L., Lin, V.C. and Mu, Y. (2016) 'Exploring Flexibility of Progesterone Receptor Ligand Binding Domain Using Molecular Dynamics', *PloS one*, 11(11), p. e0165824.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis es el resultado de un enorme esfuerzo grupal y quisiera expresar en estas brevísimas palabras mi gratitud hacia todas aquellas personas que lo hicieron posible.

En primer lugar, a mis directores Adali y Lautaro, por permitirme formar parte de este hermoso grupo de trabajo y abrirme las puertas al mundo de la investigación científica. Por su rigurosidad, sus valores y su buen humor. Por todo lo recibido y compartido que no puedo resumir acá. Gracias.

A Virginia, por formarme y acompañarme todos estos años. Por tu amistad.

Al grupo Pecci: Chocha, Eve, Maxi, Vicky, es un placer trabajar con uds. A Flopy, por hacer que todo resulte fácil. A mis compañeros del grupo SRS. Al grupo Presman: Diego, por sus aportes siempre precisos y su comentarios alentadores; Agus, por su gran compañerismo y dedicación. A ambos por estar siempre.

A todos los que transitaron por las puertas del labo 7 del CM1 y que ya son amigos: Marcos, Silvio, Lucho, Dante, Vicky, Johi, Celeste, Martín, Mariano, Lucía. A los grupos Wetzler y Di Lella. Al grupo Carcagno, a Abel por hacer del laboratorio un lugar de trabajo feliz y a Jime por hacerlo *realmente* feliz.

A mis compañeros del IFIByNE, en especial a Mechi y a Amaranta.

A mis padres, hermanos y toda la familia *extendida*. A la nueva integrante, Valentina.

Por último, y muy especialmente, a Javier, que me acompaña y sostiene en todas mis aventuras académicas. Por hacer que todo sea fácil, por cuidarme siempre. Gracias.