



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE LAS ISOFORMAS ALFA Y DELTA
DE LA PROTEÍNA CINASA C EN LA
FOSFORILACIÓN DE LOS RECEPTORES
INTRACELULARES A PROGESTERONA EN
CÉLULAS DERIVADAS DE ASTROCITOMAS
HUMANOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

BRENDA MARQUINA SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

VOCAL: Dra. Aliesha Araceli González Arena

SECRETARIO: Dra. Carolina Guzmán Arriaga

1er. SUPLENTE: Dra. Olivia Tania Hernández Hernández

2° SUPLENTE: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 107 Edificio F, Facultad de Química, Av. Universidad no. 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Distrito Federal, 04510.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Aliesha Araceli González Arenas

SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SUSTENTANTE: Brenda Marquina Sánchez

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico	mA	miliAmperes
ANOVA	Análisis de varianza	MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
ARN	Ácido Ribonucleico	mM	mili Molar
ARNm	ARN mensajero	nPKC	PKC nuevas
aPKC	PKC atípica	P4	Progesterona
BSA	Albumina Sérica Bovina	PSF	PBS con SFB al 4%
BUS	por sus siglas en inglés: <i>B-receptor upstream segment</i>	PBS	Solución buffer de fosfatos
CDK2	Cinasa dependiente de Ciclinas II	PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
CK2	Caseína Cinasa II	pS400-RP	RP fosforilado en la Ser400
cPKC	PKCs clásicas	PKC	Proteína Cinasa C
DAG	Diacilglicerol	RP	Receptor a Progesterona
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco	SDS	Dodecil sulfato de sodio
DMSO	Dimetilsulfóxido	Ser	Serina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	SFB	Suero Fetal Bovino
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	siRNA	ARN de interferencia pequeño
EGFR	Receptor del Factor Epidérmico de Crecimiento	SNC	Sistema Nervioso Central
ERP	Elemento de Respuesta a Progesterona	TBS	Solución amortiguadora Tris
ES	Error estándar	Thr	Treonina
GABA	Ácido gama-amino butírico	TPA	12 -O- Tetradecanoilforbol - 13- acetato
HSP	Proteína de choque térmico	Tris	Tris-hidroximetilaminometano
kDa	Kilo daltones	V	Voltios

Indice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes	
3.1 Estructura y función de la progesterona.....	5
3.1.1 Mecanismos de acción de la progesterona.....	8
3.2 Características del receptor a progesterona (RP).....	11
3.2.1 Isoformas del RP.....	13
3.2.2 Regulación de la expresión del RP.....	14
3.3 Proteína cinasa C.....	20
3.4 Astrocitomas.....	22
3.4.1 RP y astrocitomas.....	25
3.4.2 PKC y astrocitomas.....	26
4. Justificación.....	28
5. Hipótesis.....	29
6. Objetivos.....	29
7. Materiales y métodos	
7.1 Reactivos.....	30
7.2 Cultivo celular.....	32
7.3 Silenciamiento de PKC α , PKC δ y PKC ϵ	33
7.4 Coimmunoprecipitación.....	34

7.5 Western blot.....	34
7.6 Determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP en la Ser400 mediante citometría de flujo.....	36
7.7 Localización de PKC α y RP.....	38
7.8 Análisis de resultados.....	38
8. Resultados	
8.1 Silenciamiento de PKC α , PKC δ y PKC ϵ	39
8.2 Determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP en la Ser400.....	40
8.3 Asociación de PKC α y PKC δ con las isoformas del RP.....	42
8.4 Asociación de PKC α y PKC δ con las isoformas del RP fosforiladas en la Ser400.....	44
8.5 Localización de PKC α y RP.....	44
9. Discusión.....	48
10. Conclusiones.....	54
11. Perspectivas.....	54
12. Bibliografía.....	55

1. Resumen

La progesterona es una hormona esteroide derivada del colesterol que participa en la regulación de diversos procesos en el organismo y en el crecimiento de tumores cerebrales como los astrocitomas. La progesterona ejerce su acción a través de sus receptores intracelulares (RP), los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión de diversos genes. La fosforilación del RP en sitios específicos regula su actividad transcripcional y su degradación. Distintos trabajos han demostrado la participación de diferentes cinasas en la fosforilación del RP en 15 sitios. A través de un análisis *in silico* utilizando el programa KinasePhos, se ha detectado que el residuo serina 400 (Ser400) podría ser fosforilado por la Proteína Cinasa C (PKC). En experimentos previamente realizados en el laboratorio se determinó que el tratamiento durante 5 minutos con el éster de forbol TPA (activador de PKCs), aumentó la fosforilación en este residuo del RP.

En el presente trabajo se determinaron las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP en la Ser400. Utilizando siRNAs se inhibió la expresión de las isoformas α , δ y ϵ de PKC (PKC α , PKC δ y PKC ϵ) en células derivadas de astrocitomas humanos grado III (U373). Mediante citometría de flujo se identificó que PKC α y δ participan en esta fosforilación. Posteriormente, se estudió la asociación de PKC α y PKC δ con el RP y el RP fosforilado en la Ser400, a través de la técnica de coimmunoprecipitación. Los resultados mostraron una asociación basal para PKC α con ambas isoformas del RP, que incrementó después del tratamiento con TPA durante 5 minutos. Para RP-B este efecto disminuyó a los 10 minutos, mientras que para RP-A, se mantuvo hasta los 60 minutos. En el caso de la asociación del RP fosforilado en la Ser400 con PKC α , se observó para ambas isoformas una asociación basal que incrementó sólo para RP-B a los 5 minutos de tratamiento con TPA. Para la asociación de PKC δ con las isoformas del RP sólo se observó asociación basal con RP-B, la cual incrementó a los 60 minutos de tratamiento con TPA. Este incremento en la asociación también se observó entre PKC δ y el RP-B fosforilado en la Ser400.

Finalmente, se determinó la localización intracelular de PKC α y el RP, a través de una inmunofluorescencia. Se observó que basalmente PKC α y el RP se encuentran tanto en citoplasma como en núcleo, y que después del tratamiento con TPA durante 5 minutos PKC α migra al núcleo e incrementa la colocalización de ambas proteínas en el espacio perinuclear.

2. Introducción

La progesterona participa en la regulación de múltiples procesos en los mamíferos, entre los que se encuentran la ovulación, la conducta sexual, el embarazo y la excitabilidad neuronal. Por otro lado, la progesterona desempeña un papel importante en procesos patológicos como el cáncer, particularmente participa en el crecimiento de algunos tumores cerebrales, como los astrocitomas.

Los astrocitomas son los tumores primarios del Sistema Nervioso Central más comunes en adultos, se derivan de células gliales y tienen un alto potencial de malignidad. Los pacientes que presentan este tipo de tumores tienen una baja sobrevida.

Esta hormona lleva a cabo muchas de sus acciones a través de su interacción con su receptor intracelular (RP). El RP es un factor de transcripción activado por ligando, el cual es susceptible a modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, que regulan su actividad transcripcional y su degradación.

El RP puede ser fosforilado por diferentes cinasas como la caseína cinasa II, la cinasa 2 dependiente de ciclina por las proteínas cinasas asociadas a mitógenos y la cinasa de la glicógeno sintasa-3 β . A través de estudios *in silico* se ha detectado que el RP también podría ser fosforilado por la proteína cinasa C (PKC) en el residuo serina 400 (Ser400).

Las PKCs son una familia de serina/treonina cinasas que tienen un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la proliferación celular, la diferenciación celular, la sobrevivencia, la migración o la angiogénesis. Diferentes isoformas de PKC se han asociado a diferentes tipos de cáncer como el de colon, pulmón, mama, próstata y cerebro. En gliomas las PKCs α , δ y ϵ se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos, así como al aumento en la expresión de oncogenes. En células U373 (derivadas de astrocitomas humanos) se han detectado las isoformas α , δ y ϵ de la PKC.

En experimentos previamente realizados en el laboratorio, se detectó que después de la activación de PKCs por el tratamiento con un éster de forbol, la fosforilación en la Ser400 del RP en células U373 aumentó.

A pesar de que ya se ha estudiado el efecto proliferativo de la progesterona en líneas celulares de astrocitomas y que al activar PKCs se aumenta la fosforilación del RP en la Ser400, hasta el momento se desconocen las isoformas de PKCs que participan en la fosforilación del RP.

3. Antecedentes

3.1 Estructura y función de la progesterona

La progesterona (P4) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol que se sintetiza en las células del cuerpo lúteo, la corteza adrenal, la placenta y en neuronas y células gliales del Sistema Nervioso Central (SNC) (Graham y Clarke, 1997; Zwain y Yen, 1999).

La síntesis de P4 está regulada por hormonas como la luteinizante, la hormona estimulante de los folículos, las prostaglandinas y la adrenalina (Graham y Clarke, 1997).

La síntesis de la P4 se da por medio de la conversión del colesterol a pregnenolona, y posteriormente la conversión de ésta a P4 (Fig. 1). Estos procesos se llevan a cabo por medio de distintas enzimas localizadas en los tejidos u órganos citados anteriormente.

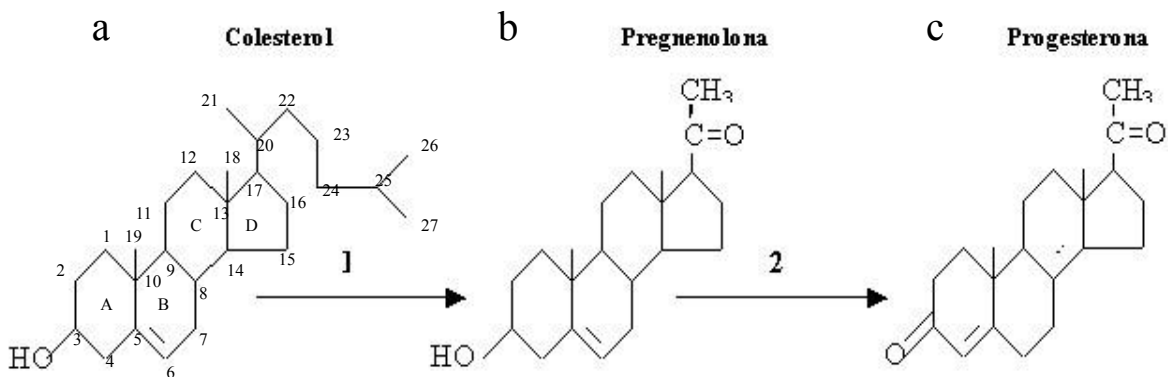


Figura 1. Biosíntesis de la P4. La biotransformación de colesterol a P₄ implica dos cambios estructurales en la molécula: de colesterol (a) a pregnenolona (b) y de esta última a progesterona (c). Enzimas implicadas: 1) 20,22 esteroide liasa; 2) 3β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa (Basada en Gore-Langton et al., 1988).

Una vez que la P4 y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, la P4 es convertida a 5α -dihidroprogesterona, metabolito susceptible a una reducción y convertido a $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona. Además puede ser convertida a 20α -hidroxiprogesterona, la cual también posee actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la de la P4. Posteriormente, en el hígado la P4 se convierte a pregnandiol, el cual se conjuga con ácido glucurónico y se excreta en la orina (Ganong, 2006).

La P4 participa en la regulación de múltiples procesos en los mamíferos entre los que se encuentran la ovulación, la conducta sexual, el embarazo, el crecimiento y diferenciación del endometrio uterino y de las glándulas mamarias. Esta hormona también participa en procesos no reproductivos como la excitabilidad neuronal, la ventilación pulmonar, el dolor y el sueño. En el sistema nervioso regula funciones como la excitabilidad neuronal, procesos de aprendizaje y memoria, la plasticidad cerebral, el sueño, la protección al daño neuronal y la neuroregeneración. (Camacho-Arroyo et al., 1995; Genazzani et al., 2000; Gonzalez-Arenas et al., 2003).

En diversos modelos de daño cerebral realizados en ratones, gatos y ratas se ha observado que la P4 posee efectos neuroprotectores contra agentes neurotóxicos como el ácido okadáico y a procedimientos traumáticos como la isquemia (Callier, 2001; Cervantes, 2002; Nilsen, 2002). A pesar de que la P4 reduce la peroxidación de lípidos después de daño traumático cerebral en rata, su mecanismo de neuroprotección no está completamente dilucidado.

Se ha descrito que la P4 modula la actividad de diferentes neurotransmisores como la del ácido gama-aminobutírico (GABA), del glutamato, de la acetilcolina, de la dopamina, de la noradrenalina y de la serotonina (Melcangi et al., 2001; Engel y Grant, 2001). En general se ha observado que la P4 disminuye la excitabilidad neuronal aumentando la actividad de GABA o modulando la del glutamato (Melcangi et al., 2001; Engel y Grant, 2001). De hecho, la P4 tiene efectos anestésicos en diferentes especies y posee actividad anticonvulsiva tanto en modelos experimentales como en humanos (Beyenburg et al., 2001).

La P4 también desempeña un papel importante en procesos patológicos como el cáncer. Se ha demostrado que la P4 es un regulador clave en el desarrollo y progresión de cánceres relacionados con el sistema endócrino, especialmente los del aparato reproductor. La proliferación de muchos tipos de células cancerígenas está bajo el control de la P4.

Los mecanismos relacionados con los efectos proliferativos de la P4 en el ciclo celular han sido estudiados principalmente en células de cáncer de mama humano, como la línea celular T47D. En estudios realizados en esta línea, se ha observado que la P4 induce la progresión del ciclo celular a través de la inducción de la expresión de genes asociados con la regulación de dicho ciclo como las ciclinas (Sutherland et al., 1998), factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) (Murphy et al., 1986), así como protooncogenes asociados con la actividad proliferativa como c-myc y c-fos (Musgrove et al., 1991). Los efectos antes mencionados pueden ser bloqueados por el compuesto RU486, el cual es un antagonista del RP.

La expansión de los tejidos tumorales requiere de nuevos vasos sanguíneos para su desarrollo. Se ha reportado que progestinas naturales y sintéticas usadas como anticonceptivos orales o en terapias de reemplazo hormonal, inducen la expresión de genes involucrados en la angiogénesis como VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) en células T47D a través del RP.

La P4 y sus receptores influyen en la proliferación de células derivadas de astrocitomas tanto *in vitro* como *in vivo* (Germán-Castelán L., en preparación). En el apartado 3.4.1 *RP y astrocitomas*, se profundizará más sobre el papel de la P4 y el RP sobre este tipo de tumores.

3.1.1 Mecanismos de acción de la progesterona

La P4 actúa en sus células blanco a través de dos mecanismos principales denominados genómico (clásico) y no genómico (membranal). El primero involucra la interacción de la P4 con receptores intracelulares específicos, denominados RP, y está relacionado con los efectos a largo plazo de la P4; mientras que el segundo requiere de la interacción de la hormona con receptores membranales, canales iónicos, o bien con receptores intracelulares que activan cascadas de fosforilación como la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Fig. 2) (Camacho-Arroyo et al., 2003; Camacho-Arroyo et al., 1995; Schumacher et al., 1999; Dressing et al., 2009).

La mayoría de los efectos de la P4 sobre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular están mediados por sus receptores intracelulares (RP) (Camacho-Arroyo et al., 2003), los efectos ocurren de la siguiente manera: la P4 ingresa a la célula por difusión simple; ya en el núcleo se une al RP que previamente se encontraba unido a proteínas chaperonas (proteínas de choque térmico). La unión de la P4 al RP provoca un cambio conformacional en éste que lo separa de las proteínas chaperonas permitiendo su dimerización y fosforilación, resultando en una estructura con alta afinidad por secuencias específicas en el ADN llamadas elementos de respuesta hormonal (ERH) que en el caso del RP se denominan elementos de respuesta a P4 (ERP). Posteriormente el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de preiniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por la P4, favoreciendo así la transcripción (Fig. 3) (Liu et al., 2001).

Dentro de las acciones no genómicas de la P4 se encuentran la activación de receptores de membrana específicos, la interacción en sitios alostéricos en receptores como el receptor a GABA y diversas vías de señalización que involucran cinasas tales como las MAPKs (Camacho-Arroyo et al., 2003). Las MAPKs que se activan en presencia de P4 son capaces de fosforilar al RP, inducir su degradación a través del proteosoma 26S y aumentar su actividad transcripcional (Camacho-Arroyo et al., 2002; Lange et al., 2000).

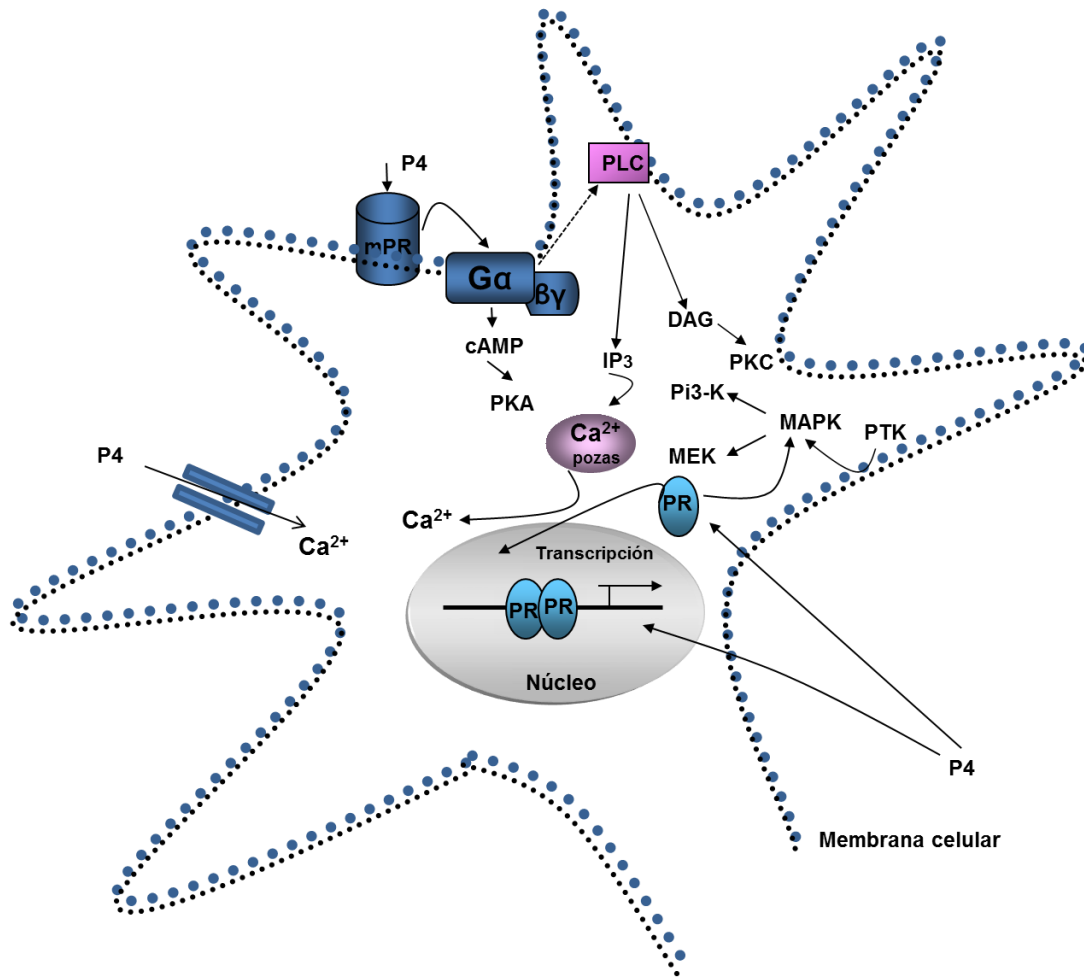


Figura 2. Mecanismos de acción de la P4. La P4 actúa mediante dos mecanismos, el genómico y el no genómico. El genómico es mediado por el RP nuclear y produce cambios en la expresión génica. El no genómico esta mediado por la interacción con receptores de membrana y canales desencadenando señales intracelulares. G: Proteína G, $\alpha\beta\gamma$: subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinasa A, RP: Receptor a P4, PLC: Fosfolipasa C, IP3: Inositol Trifosfato, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PTK: Proteína de tirosina cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, MEK: Cinasa de MAPK, Ca^{2+} : Calcio. (Tomada de González-Arenas y Hernández-Hernández, 2011)

Dentro de las acciones no genómicas de la P4 se encuentran la activación de receptores de membrana específicos, la interacción en sitios alostéricos en receptores como el receptor a GABA y diversas vías de señalización que involucran cinasas tales como las MAPKs (Camacho-Arroyo et al., 2003). Las MAPKs que se activan en presencia de P4 son capaces de fosforilar al RP, inducir su degradación a

través del proteosoma 26S y aumentar su actividad transcripcional (Camacho-Arroyo et al., 2002; Lange et al., 2000).

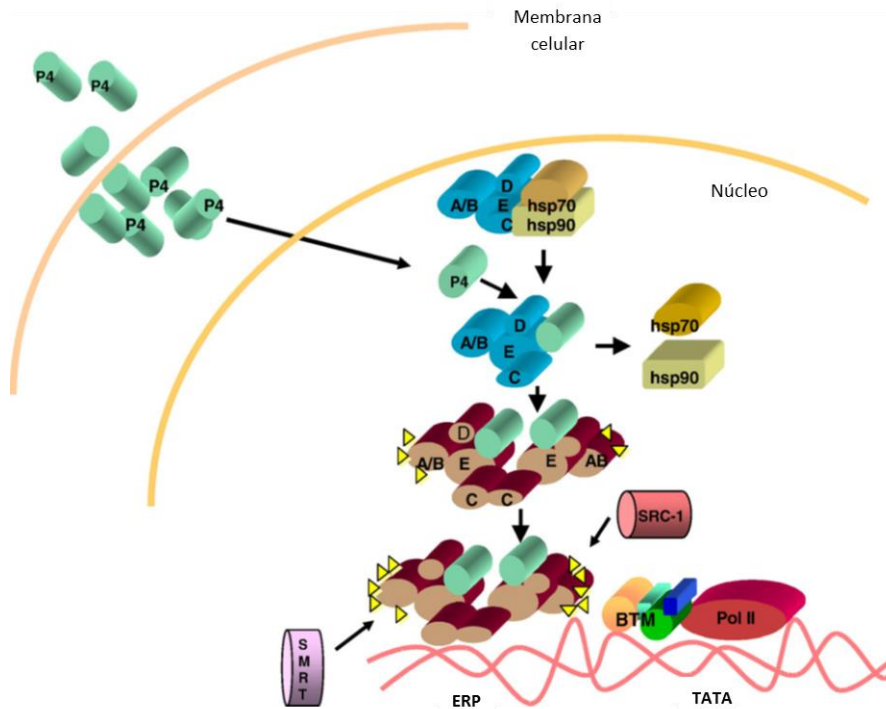


Figura 3. Regulación de la expresión génica por la P4 vía RP intracelular. En la forma libre, el RP está asociado a proteínas chaperonas como las proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70. Tras la unión de la P4, el RP se disocia de las proteínas chaperonas y se dimeriza con otra molécula de RP. Posteriormente, el RP se fosforila (triángulos) y forma complejos con cofactores como el coactivador SRC-1 (coactivador de receptores a esteroides) o el correpressor SMRT (mediador de silenciamiento para receptores retinoides y tiroideos). El RP interactúa con elementos de respuesta a progesterona (ERP) en la región promotora de genes blanco de la P4 y recluta a la maquinaria de transcripción basal (BTM) involucrada en la expresión génica. A/B, C, D y E son dominios del RP (Tomado de Camacho-Arroyo, 2007).

3.2 Características del receptor a progesterona

El RP pertenece a una familia de factores de transcripción activados por ligando y está compuesto por cuatro dominios (Tsai y o'Malley, 1994; Tata, 2002).

1) El dominio amino terminal (A/B) participa en la regulación de la transcripción de

genes blanco, este es el dominio que varía para cada isoforma. 2) Dominio de unión al ADN (C), participa en el proceso de dimerización y en la unión al ADN, en este dominio se encuentran los dedos de zinc que permiten esta unión. 3) Dominio bisagra (D) participa en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas del choque térmico y en la localización nuclear ya que contiene el péptido señal de localización nuclear. 4) Dominio de unión al ligando (E) Participa en la interacción con el ligando y en la regulación de transcripción (Fig 4).

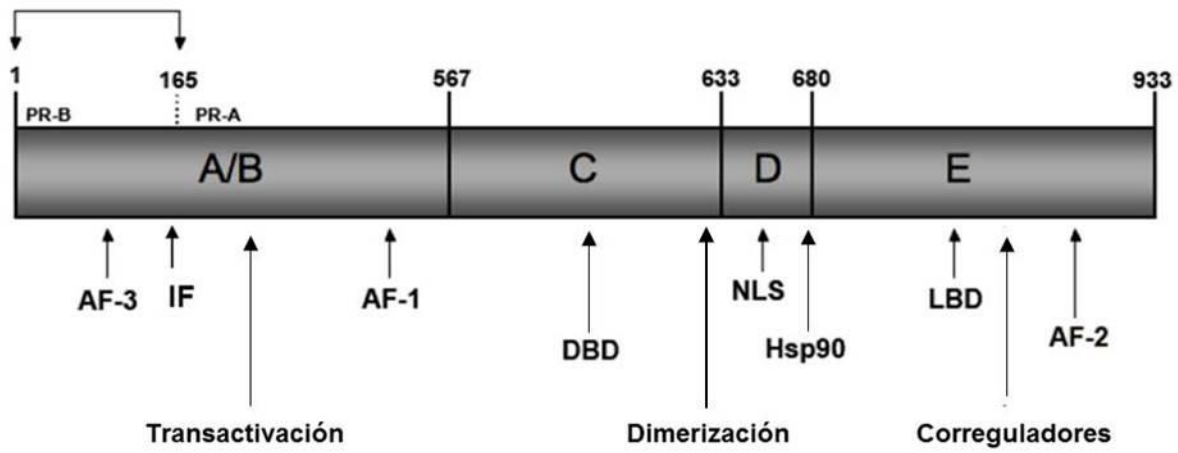


Figura 4. . Representación esquemática de los dominios del RP. El receptor consta de cinco dominios denominados de la A a la E. Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delimitan el inicio y término de cada dominio, mientras que las flechas (↓) indican el sitio de inicio de la traducción de las dos isoformas. El dominio (A/B) se encuentra en el extremo amino terminal y tiene dos funciones de activación (AF) y una función de inhibición (IF) que participan en la regulación de la transcripción de los genes blanco. El dominio C contiene el dominio de dimerización y el dominio de unión al ADN (DBD) que se caracteriza por tener dos dedos de zinc. El dominio D tiene las secuencias de localización nuclear (NLS) y la de unión a chaperonas (Hsp90). El dominio E tiene la región de unión al ligando (LBD), la de unión a correguladores y hacia el extremo carboxilo terminal tiene una función de activación (AF-2). Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delimitan el inicio y término de cada dominio. (Modificada de Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

3.2.1 Isoformas del RP

En el ser humano se han caracterizado dos isoformas del RP denominadas RP-A (94kDa) y RP-B (116) (Camacho-Arroyo et al., 2009)

Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen, que en humanos está comprendido por 8 exones, localizado en el cromosoma 11q22-23, sin embargo, están regulados por diferentes promotores (Conneely et al., 1989; Misrahi et al., 1993; Kastner et al., 1990). La diferencia entre RP-B y RP-A se debe a la presencia de 164 aminoácidos en el extremo amino terminal del RP-B. Este segmento es conocido como BUS (por sus siglas en inglés: *B-receptor upstream segment*). (Conneely y Jericevic, 2002; Giangrande y McDonnell, 1999).

Las isoformas del RP tienen diferentes funciones que dependen del contexto celular y el gen blanco (Wen et al., 1994; Vegeto et al., 1993). RP-B y RP-A pueden coexistir en la misma célula y después de su activación por progesterona se pueden unir al ADN como 3 especies diméricas: A:A, B:B y A:B (Carbajo et al., 1996).

A pesar de que RP-B y RP-A regulan diferentes genes, en general, RP-B es un mejor activador de la transcripción que RP-A. Por otro lado, RP-A es un represor de la transcripción mediada por RP-B, sugiriendo que RP-A podría disminuir los efectos biológicos de la progesterona en algunos tejidos. (Jacobsen y Horwitz 2012; Camacho-Arroyo, Rodriguez-Dorantes, 2006).

Las diferencias en la actividad transcripcional de las isoformas del RP están relacionadas con su estructura. En la región BUS, ubicada del aminoácido 1 al 165, RP-B posee una única función activadora (AF-3), la cual está ausente en el RP-A. La función inhibitoria (IF), sólo está activa en el RP-A (Sartorius et al., 1994; Huse et al., 1998). Otro elemento que participa en el contraste de la actividad transcripcional de ambas isoformas del RP es su unión a cofactores. RP-A presenta una mayor afinidad a correpresores como SMRT (silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinóico), mientras que RP-B a

coactivadores como SRC-1 (coactivador de los receptores a hormonas esteroideas) (Giangrande y McDonnell, 2000).

3.2.2 Regulación de la expresión del RP

La regulación del RP varía de manera tejido-específica tanto en tejidos normales como neoplásicos (CabreraMunoz et al., 2009; González-Arenas et al., 2003; Guerra-Araiza et al., 2003). De manera general, se ha observado que el RP es regulado de manera positiva por estrógenos, ya que el gen del RP contiene elementos de respuesta a estrógenos, y es regulado de manera negativa por la P4, ya que la unión del RP a su ligando induce su degradación en diferentes tejidos blanco como el útero y el hipotálamo (Camacho-Arroyo et al., 1998; Camacho-Arroyo et al., 1996; Graham y Clarke, 1997).

El RP sufre modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, sumoilación, acetilación y ubiquitinación (Hagan et al., 2012).

El estado de fosforilación del RP puede influenciar su localización celular, actividad transcripcional, tasa de recambio, formación de complejos protéicos y especificidad de genes blanco. (Qiu et al., 2003; Pierson-Mullany y Lange 2005; Faivre et al., 2008).

La fosforilación del RP es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por P4. El RP de humano contiene 15 sitios de fosforilación (Fig. 4), de los cuales 10 han sido identificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro* e *in vivo* (Ser20, Ser81, Ser102, Ser162, Ser190, Ser213, Ser294, Ser346, Ser400, Ser676) y 5 únicamente por fosforilación *in vitro* (Ser25, Ser130, Ser390, Thr430, Ser554) (Zhang et al., 1994 y 1997; Lange et al., 2000; Knotts et al., 2001; Wang et al., 2013). Hasta ahora se sabe que la P4 induce la fosforilación del RP en tres residuos que son la Ser102, Ser294 y Ser345 y que los residuos Ser81, Ser162, Ser190, Ser390, Ser400 son sitios ya fosforilados en

condiciones basales que incrementan su fosforilación después del tratamiento con la hormona (Zhang et al., 1994 y 1995).

Se han detectado seis sitios de fosforilación que son exclusivos para la isoforma B del RP humano en los residuos Ser20, Ser25, Ser81, Ser102, Ser130 y ocho sitios de fosforilación que son comunes para ambas isoformas en los residuos Ser190, Ser213, Ser294, Ser345, Ser400, Thr430, Ser554 y Ser676 (Knotts et al., 2001) (Fig 5).

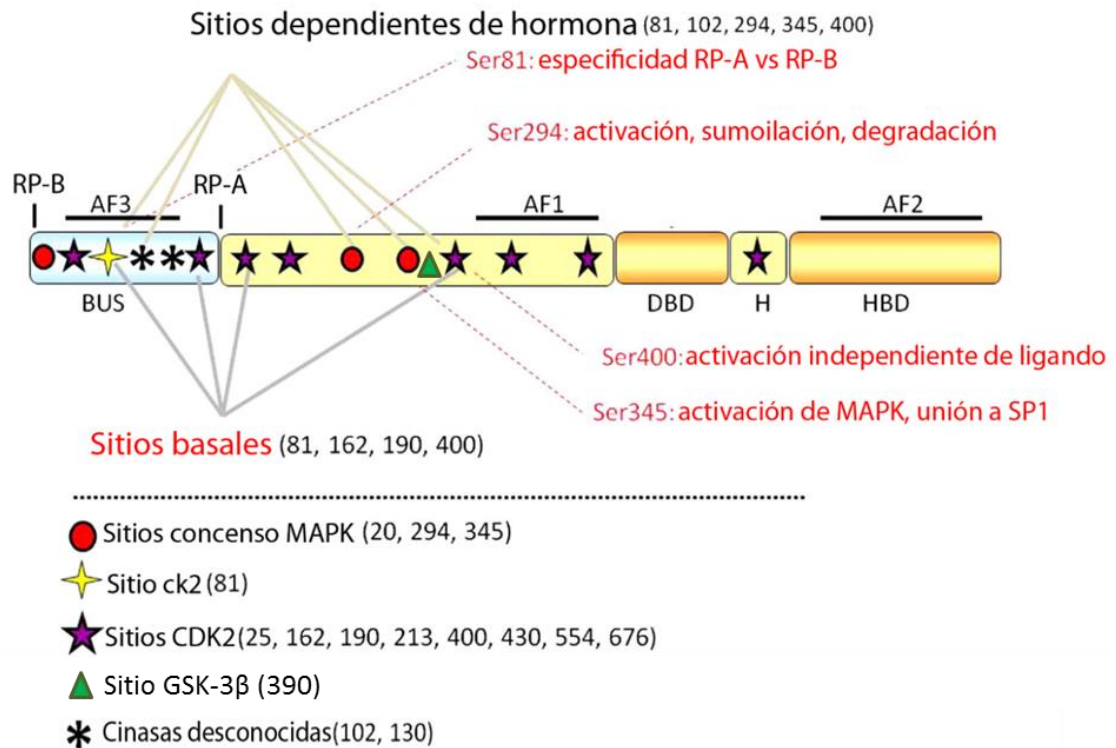


Figura 5. Estructura del receptor a progesterona (RP) y sitios de fosforilación. Las isoformas RP-A y RP-B son transcritas a partir del mismo gen y contienen promotores distales y proximales. Se muestran los 3 dominios de activación (AF), el segmento único de B, *B-upstream* por sus siglas en inglés (BUS), el dominio de unión al ADN (DBD), la región bisagra (HBD) y el sitio de unión a hormona (HBD). El RP es fosforilado basalmente, así como en respuesta a hormonas. Se muestran los sitios de fosforilación del RP determinados *in vitro* e *in vivo*, y las cinasas responsables en la fosforilación directa en estos sitios. GSK-3β: Cinasa de la glucógeno sintasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, CK2: Caseín Cinasa 2, CDK2: Cinasa 2 Dependiente de Ciclina(Tomado de Hagan et al., 2011).

Hasta el momento se conoce que cuatro diferentes cinasas son capaces de fosforilar al RP: la caseína cinasa II (CK2) (Zhang et al., 1994), la cinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2) (Knotts et al., 2001; Zhang et al., 1997), por las proteínas cinasas activadas a mitógenos (MAPK-44 y MAPK-42) (Lange et al., 2000) (Fig. 5) y la cinasa de la glicógeno sintasa-3 β (GSK-3 β), recientemente reportada por el grupo de Wang (Wang et al., 2013).

Las consecuencias funcionales específicas de la fosforilación en la mayoría de los residuos de serina del RP no han sido definidas, sin embargo, algunos sitios están bien caracterizados. Como es el caso de la serina 294, este residuo es fosforilado por la vía de MAPK en respuesta a la señalización de factores de crecimiento, como lo es el EGF y en respuesta a la activación de la CDK2 (Shen et al., 2001; Daniel et al., 2007).

La fosforilación del RP en el residuo serina 294 envía al receptor al núcleo y eleva su actividad transcripcional, mientras que simultáneamente disminuye su estabilidad en la célula al marcarlo para ubiquitinación (Lange et al. 2000; Qiu y Lange, 2003).

Muchos factores de transcripción son modificados por la unión del pequeño modificador parecido a ubiquitina (SUMO) de manera dependiente de la fosforilación. SUMO (~ 10 kDa) se une reversiblemente a residuos de lisina de las proteínas blanco, alterando interacciones proteína-proteína, localización celular, estabilidad y actividad transcripcional. (Yang et al., 2003).

Una población del RP es sumoilada en el residuo lisina 388 (Lys388) en respuesta al tratamiento con progestinas. La sumoilación del RP en Lys388 resulta en una represión transcripcional, mientras que la fosforilación en Ser294 revierte este efecto. La fosforilación en Ser294 regula negativamente la sumoilación en el residuo Lys388. (Daniel et al., 2007).

Se ha demostrado que la fosforilación dependiente de ligando de la serina 345 afecta el sinergismo transcripcional del RP en la presencia de progestinas y

MAPKs, además de facilitar la unión del RP a sitios SP1 de los genes p21 y EGFR (Faivre et al., 2008)

El residuo serina 400 del RP es fosforilado basalmente y en respuesta a mitógenos. La fosforilación del RP en la serina 400 por CDK2 es requerida para la rápida localización nuclear y para regular la actividad independiente de ligando del RP (Pierson-Mullany y Lange, 2004).

Estudios realizados en células HeLa mutando el RP en el residuo Ser211 por alanina, muestran que en estas células sólo hay un 25% de la actividad transcripcional respecto a las normales; cuando se mutó la Ser530 se observó un menor plegamiento del RP, lo que sugiere que la fosforilación mantiene al receptor en estado activo (Weigel, 1995). En células T47D se ha observado que la fosforilación del RP aumenta su actividad transcripcional después del tratamiento con R5020, un agonista del RP (Shen et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente, la P4 induce la fosforilación del RP, lo que ocasiona un aumento en la actividad transcripcional así como la inducción de la degradación del receptor por el proteosoma 26S (Lange, 2004). El residuo Ser294 fosforilado de manera dependiente de ligando es la señal para que el RP sea degradado por la vía Ubiquitina-Proteosoma 26S. Por otro lado se ha sugerido que la Ser400 puede estar implicada tanto en el recambio como en la actividad transcripcional del RP, ya que cuando se intercambia una alanina por la serina en esta posición tanto la actividad transcripcional como el contenido del RP se incrementan (Pierson-Mullany et al., 2004).

Se tienen datos que indican que en células CV1 (células de riñón de mono) tratadas con ácido okadáico (inhibidor de fosfatasas PP1 y PP2A), se incrementa la fosforilación del RP así como su actividad transcripcional (Denner et al., 1990). Se ha encontrado que en células T47-D al ser tratadas con este inhibidor de fosfatasas, aumenta la actividad transcripcional del RP inducida por R5020 (agonista del RP) (Beck et al., 1992).

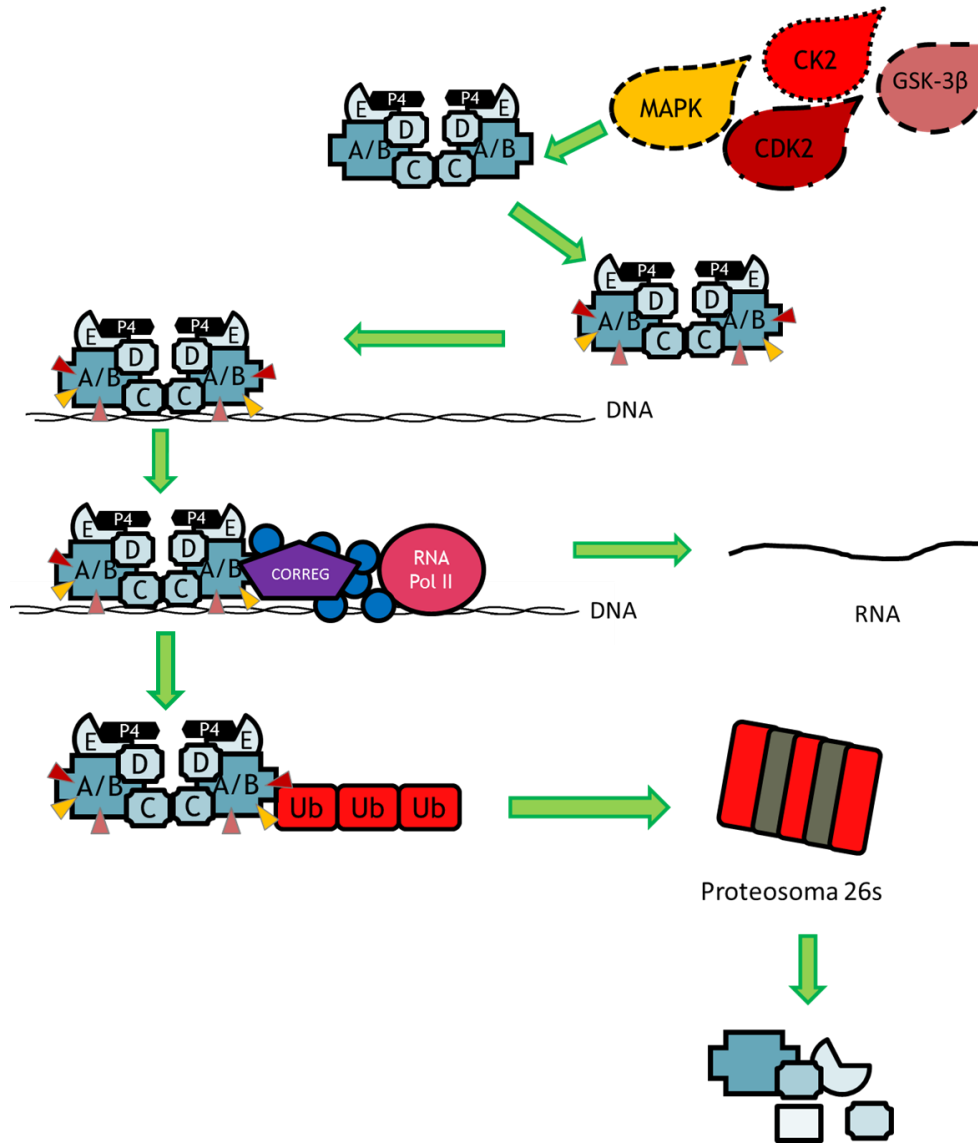


Figura 6. Esquema de la activación y fosforilación del RP. El RP puede ser fosforilado por cinasas como CK2, CDK2, MAPK y GSK-3 β , ya fosforilado el RP tiene actividad transcripcional y es marcado para ser degradado por el proteosoma 26S. A/B, C, D, E: Subunidades del RP, P4: Progesterona, GSK-3 β : Cinasa de la glucógeno sintasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, CK2: Caseína Cinasa 2, CDK2: Cinasa 2 Dependiente de Ciclina, DNA: Ácido Desoxirribonucleico, SRC: Coactivador de Receptores Esteroides, RNA Pol II: RNAPolimerasa, RNA: Ácido Ribonucleico, Ub: Ubiquitina.

La ubiquitinación del RP lo prepara para ser degradado por el proteosoma 26S, localizado en núcleo y en el citoplasma (Yang et al., 2003).

La fosforilación de sitios específicos del RP está acoplada a múltiples funciones del mismo, incluyendo la localización nuclear en respuesta a la activación de MAPK, sinergismo transcripcional en presencia de P4 y regulación a la baja por acción del complejo ubiquitina-proteosoma 26S (Lange, 2004).

En la figura 6 se esquematiza el mecanismo de fosforilación, activación y degradación del RP.

3.3 Proteína cinasa C

Las proteína cinasa C (PKC) comprende una familia de isoenzimas con actividad de serina/treonina cinasas codificadas por diferentes genes. Forman parte de una gran cantidad de cascadas de señalización, además de estar implicadas en una amplia gama de respuestas celulares dependientes de factores de crecimiento y receptores acoplados a proteínas G (Steinberg et al., 2008).

Las PKCs están formadas por: 1) Un dominio catalítico altamente conservado y 2) Un dominio regulador en el extremo amino-terminal con una región de pseudosustrato autoinhibidora que mantiene la enzima en una conformación inactiva, y dos módulos de unión a membrana llamados C1 y C2. (Steinberg et al., 2008) (Fig. 6).

Las PKCs pueden ser clasificadas en 3 grupos dependiendo de sus regiones reguladoras: clásicas, nuevas y atípicas. Las PKCs clásicas (cPKCs): PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ , son activadas por diacilglicerol (DAG), calcio y un fosfolípido como fosfatidilserina. Las PKC nuevas (nPKCs): PKC ζ , PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ , no requieren de calcio para activarse pero son reguladas por DAG y fosfolípidos. Las cPKCs y las nPKCs puede también ser activadas por compuestos sintéticos como los ésteres forbol, los cuales interactúan con el mismo sitio de unión que el DAG, el más utilizado es el 12 -O- Tetradecanoilforbol -13-acetato(TPA)

Las PKCs atípicas (aPKCs), PKC ξ y PKC λ , son independientes de calcio y no requieren DAG para su activación, éstas pueden ser activadas por ceramida, pero principalmente por interacciones proteína-proteína y por fosforilaciones (Fig. 7) (Mackay y Twelve, 2007; Steinberg et al., 2008).

Isoformas de PKC: Estructura de Dominios

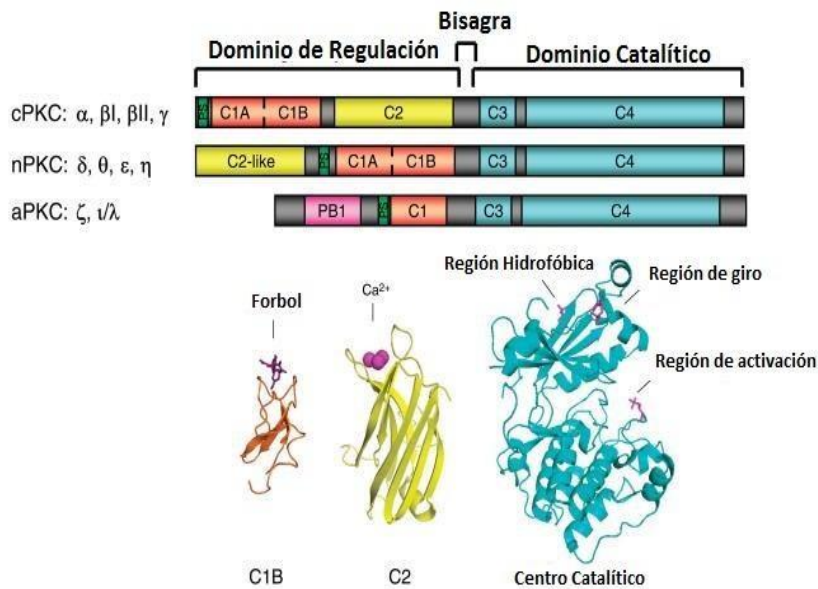


Figura 7. Estructura y familias de PKC. La parte superior de la figura muestra los dominios de las diferentes familias de PKC. Las PKCs clásicas (cPKCs) poseen una región de unión a DAG o TPA (C1A y C1B) y una región dependiente de calcio (C2), por otro lado, la región C2 de las PKCs nuevas (nPKCs) no es dependiente de calcio, pero su región C1 sí interactúa con DAG o TPA. La región C1 de las PKCs atípicas (aPKCs) no es capaz de permitir la activación de la enzima por DAG o TPA, la región PB1 es la que regula la activación mediante interacciones proteína-proteína. Todas las PKC poseen el dominio catalítico altamente conservado. La parte inferior presenta esquemas de los dominios C1, C2 y del sitio catalítico (Tomada de Steinberg, 2008).

Luego de su activación, las PKCs se translocan a la membrana celular, las PKCs clásicas migran a la membrana de manera rápida mediante un mecanismo que involucra acumulación de DAG (debida a la fosfolipasa C) posteriormente, dependiendo de la célula y de la isoenzima, pueden ser liberadas de la membrana en un mecanismo dependiente de la actividad catalítica propia de la enzima (Steinberg et al., 2008).

La regulación de PKC no sólo depende de su translocación, también pueden ser controladas por fosforilaciones dadas por otras cinasas o autofosforilaciones, en residuos de serina/treonina muy conservados de la región carboxilo terminal y en el caso de PKC δ , en residuos de tirosina (Li, 1995; Denning, 1996). Esta fosforilación libera el pseudosustrato (el cual actúa como un autoinhibidor) del sitio catalítico, dejando activa a la isoforma de PKC (Newton et al., 1997).

3.4 Astrocitomas

Los tumores cerebrales son patologías numerosas de múltiples características que producen diversos síntomas neurológicos como consecuencia de su tamaño, localización y capacidad invasiva. Estos tumores constituyen del 10 al 15% del total de las neoplasias que se presentan en el ser humano, pueden ser primarios (los más comunes) si se originan dentro del Sistema Nervioso Central o secundarios si se originan fuera del Sistema Nervioso Central y migran a éste (Felix et al., 1995). Dentro de los tumores cerebrales, los gliomas son los más frecuentes, constituyendo el 70% (Schwartzbaum et al., 2006).

Los astrocitomas son los gliomas más comunes y están compuestos de astrocitos neoplásicos. Los astrocitomas se localizan en cualquier parte del encéfalo especialmente en la corteza cerebral, microscópicamente tiene una apariencia uniforme con alta actividad proliferativa (Nguyen et al., 1984).

Los síntomas más comunes de los astrocitomas son dolor de cabeza, pérdida de la memoria, pérdida de la vista, convulsiones, y cambios en el comportamiento. Otros síntomas pueden ocurrir dependiendo del tamaño y localización del tumor (Fountaine et al., 2006).

La Organización Mundial de la Salud ha clasificado los astrocitomas en cuatro grados de acuerdo a criterios morfológicos, histológicos, capacidad de invasión y progresión, en cuatro grados de evolución, siendo los de grado I biológicamente menos agresivos y los de grado IV los de mayor agresividad:

Los astrocitomas de grado I, también conocidos como astrocitomas pilocíticos, son de crecimiento lento y se presentan principalmente en niños y adultos jóvenes. Crecen principalmente en cerebelo, hipotálamo y rutas del nervio óptico. Histológicamente se caracterizan por un patrón bifásico de tejidos compacto (densos agregados de astrocitos bipolares alargados) y laxo (astrocitos multipolares redondos en asociación con microquistes y gránulos eosinofílicos). Presentan bordes relativamente bien definidos y son tumores no-infiltrantes, aunque en ocasiones pueda observarse proliferación vascular glomerular, ésta no es considerada como una señal de malignidad. Este tipo de tumores son usualmente por cirugía. Los pacientes con este tipo de tumores tienen una esperanza de vida de 11 a 14 años (Bristol et al., 2009).

Los astrocitomas de grado II, también conocidos como astrocitomas difusos, afectan comúnmente a adultos entre 30 y 40 años de edad. Estos tumores están caracterizados por un alto grado de diferenciación, bajo grado de infiltración difusa en el cerebro y bordes no definidos. Histológicamente, se observa un moderado incremento celular, astrocitos bien diferenciados y con atipia nuclear ocasional. Estos tumores generalmente no son resecables por cirugía, y requieren de radioterapia, muchos de estos tumores pasan a un grado mayor de evolución. Los pacientes con este tipo de tumores tienen una esperanza de vida de aproximadamente 7 años (Hullerman et al., 2005).

Los astrocitomas de grado III son también conocidos como astrocitomas anaplásicos. Según la clasificación de la OMS 2007, los astrocitomas anaplásicos constituyen el 4% de todos los tumores primarios del Sistema Nervioso Central. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 45 y 70 años de edad. Los astrocitomas de grado III están caracterizados por ser multicelulares, formados por células multinucleadas no uniformes, invadir los tejidos vecinos, presentar un notable pleomorfismo y anaplasia, y mitosis atípicas abundantes sin presentar extensas necrosis. El tratamiento consiste en cirugía, haciendo la máxima remoción posible del tumor sin causar deficiencias neurológicas, seguida de quimio

y radioterapia. Los pacientes con este tipo de tumores tienen una esperanza de vida de 2 a 3 años (Louis et al., 2007).

Los astrocitomas de grado IV comúnmente llamados glioblastomas pueden estar compuestos por diferentes tipos celulares como astrocitos, oligodendrocitos. El glioblastoma es el tumor primario cerebral más frecuente y el más agresivo. Su incidencia es de 3-4 casos por 100.000 habitantes por año. Existen dos tipos de glioblastoma según su origen: primario o de novo, los cuales están derivados de células troncales cancerosas, son los más agresivos y son la forma más común de los astrocitomas grado IV; secundario, son los que se originan de un tumor de menor grado y evolucionan hacia grado IV (Furnari et al., 2007).

Los glioblastomas presentan una rápida evolución, y están localizados preferentemente en los hemisferios cerebrales, ganglios basales y tálamo. Llegan a medir 5 centímetros, presentan áreas hemorrágicas con células redondas pequeñas, ovoides hasta agregados celulares grandes. Existe secreción de factores estimulantes de proliferación de vasos sanguíneos, provocando angiogénesis y presentan además células con grandes cantidades de filamentos, desprovistas de desmosomas y nucléolos prominentes (Sarkar et al., 2009).

El tratamiento consiste en cirugía seguida de quimio y radioterapia, en conjunto con temozolomida (Temodal, Merck Sharp &Dohme) el cual es un antineoplásico alquilante. Los pacientes con este tipo de tumores tienen una esperanza de vida menor a un año. (Hullerman et al., 2005).

3.4.1 RP y astrocitomas

En los astrocitomas, la expresión del RP se relaciona directamente con el grado de evolución, es decir, a mayor grado de evolución, mayor expresión del RP (Pinski et al., 1993, González-Agüero et al., 2007; Khalid et al., 1997). En un estudio realizado en pacientes con astrocitoma grado IV, el 100% de los tumores expresó al RP, mientras que solo el 83% de los tumores grado III lo expresó (Gonzalez-Agüero et al., 2001).

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la P4 a través de su receptor, induce la proliferación de las líneas celulares U373 y D54 (derivadas de un astrocitomas grado III y IV respectivamente), donde la regulación del ciclo celular mediada por P4 depende del grado de evolución del tumor. También se demostró que la administración del RU486 a ratones inoculados con células de glioblastoma reduce el crecimiento tumoral inducido por P4.

Se ha demostrado que las isoformas A y B del RP se expresan diferencialmente en astrocitomas humanos. De igual manera, en las líneas U373 y D54, derivadas de grado II y IV respectivamente, se ha observado una expresión diferencial de las isoformas del RP, mientras que en la línea U373 se observa una mayor cantidad de RP-B, en una relación 3:1 con respecto a RP-A, en la línea D54 la forma predominante es RP-A, en una relación 0.66:1 con respecto a RP-B.

Estudios realizados en células U373 sobre-expresando la isoforma RP-A, se observó que al tratar con P4, no hubo un aumento en el número celular inducido por esta hormona. Lo anterior sugiere que el RP-A tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento celular cuando es activado por su ligando, y que el efecto de la P4 en la proliferación celular de astrocitomas grado III depende de la expresión de las isoformas del RP (Gonzalez-Agüero 2007; Cabrera-Muñoz 2009). La vascularización es un factor muy importante para la progresión e invasión de estos tumores, se ha reportado que la P4 aumenta la expresión de VEGF y EGFR en células D54 (Hernández-Hernández et al., 2012). Dicho aumento mediado por el RP también se ha observado en otros modelos de cáncer (Cabrera-Muñoz et al., 2011). Estos resultados demuestran la importancia de la expresión y regulación del RP en la progresión de este tipo de tumores.

3.6 *PKC y gliomas*

Debido a su diversidad de sustratos, las PKCs tienen un papel central en la señalización de la proliferación, diferenciación, apoptosis y angiogénesis. Por lo que la desregulación en la actividad de estas cinasas se ha visto implicada en

procesos patológicos como el cáncer (El-Rayes et al., 2008 ; Konopatskaya y Poole 2009) .

Sin embargo, las isoenzimas desempeñan diferentes papeles en el desarrollo del tumor. La sobreexpresión de PKC ϵ favorece el crecimiento tumoral mientras que PKC δ tiene efectos anti-proliferativos. Estas funciones son tejido-dependientes, por lo que la sobreexpresión o actividad desregulada de las PKCs no siempre son indicadores de los mismos efectos (El-Rayes et al., 2008). Esto resalta la importancia de comprender a profundidad los efectos y mecanismos de PKCs en el desarrollo de los tumores. En gliomas, las PKCs α , δ y ϵ se han asociado a procesos invasivos y anti-apoptóticos así como al aumento en la expresión de oncogenes (Sarkar y Yong 2009; Sharif 1999; Tomiyama et al., 2009).

La activación de PKC α confiere a las células resistencia a la apoptosis en diversos modelos y bajo diferentes estímulos, en especial la apoptosis inducida por radiación; la sobreexpresión de PKC α confiere a la célula resistencia a apoptosis radio-inducida (Nakajima et al., 2008). Se ha comprobado *in vitro* que PKC α activa la vía de ERK y NF κ B, induciendo la activación de metaloproteasas que aumentan la migración e invasión de este tipo de tumores (Lin et al., 2010).

De manera similar, se ha observado que PKC δ participa en la activación de metaloproteasas inducida por tenacina, una proteína de la matriz extracelular (Sarkar y Yong, 2010). Por otro lado, PKC δ se ha asociado a la inducción de apoptosis por radiación, mediante la activación de la proteína Atm (ataxia telangiectasia mutated) cinasa que participa en la reparación del daño en el ADN en el ciclo celular. (Nakajima et al., 2008). Este tipo de interacciones con diferentes vías de señalización, se ha reportado en otros tipos de tumores, por ejemplo, en cáncer de próstata se ha observado que PKC δ activa las cascadas de p38, c-jun, JNK, ERK, NF κ B y otras, regulando la apoptosis y sobrevivencia de este tipo de tumores (Chen et al., 2012).

Se ha reportado que PKC ϵ tiene un papel tanto de inductor de la proliferación como de muerte celular, siendo estos efectos tejido-específicos (Okhrimenko et al.,

2005). PKC ϵ está sobreexpresada y constitutivamente activada en gliomas. En este tipo de tumores se ha reportado que PKC ϵ induce la proliferación y la evasión de la apoptosis (Okhrimenko et al., 2005), además se ha asociado a la invasión por activación del factor de transcripción STAT3 (Aziz et al., 2010).

En células U373 se han detectado las isoformas α , δ y ϵ de las PKC (González-Arenas et al., 2006). La participación de esta familia de enzimas en la fosforilación, activación y posterior degradación del RP no ha sido estudiada. A través de un análisis *in silico* utilizando el programa KinasePhos (Huang et al., 2005), se identificó que PKC puede fosforilar al RP en dos posibles residuos, Ser400 y Thr430.

En experimentos previamente realizados en el laboratorio se demostró que en células U373, al activar PKCs con TPA, aumenta la fosforilación en el residuo Ser400 del RP. Este aumento es significativo a los 5 minutos de tratamiento con TPA.

4. Justificación

Se sabe que las PKCs tienen un papel en el desarrollo de gliomas y que son capaces de fosforilar al RP en el residuo Ser400 modificando así su actividad transcripcional, sin embargo se desconoce qué isoformas de PKC participan en esta fosforilación, y si existe una asociación de estas cinasas con las isoformas del RP.

5. Hipótesis

Si las isoformas de PKC α , δ y ϵ participan en la fosforilación de las isoformas del RP en el residuo Ser400, entonces al inhibirlas se observará un decremento en la fosforilación en este residuo y en la asociación de estas cinasas con las isoformas del RP en la línea celular U373.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

-Estudiar el papel de las PKCs α , δ y ϵ en la fosforilación de las isoformas del RP en el residuo Ser400 y la asociación de estas cinasas con el RP, en la línea celular U373 derivada de un astrocitoma humano grado III.

6.2 Objetivos particulares

-Determinar las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP en la Ser400.

-Determinar la asociación de las PKCs que participan en esta fosforilación con las isoformas del RP.

- Determinar la asociación de las PKCs que participan en esta fosforilación con las isoformas del RP fosforilado en la Ser400.

-Determinar la localización intracelular del RP con las PKCs que se asocian con el RP.

7. Materiales y métodos

7.1 Reactivos

Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM, In Vitro S. A.) con rojo fenol complementado con suero fetal bovino 10% (PAA), piruvato 1 mM (Gibco) y aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Gibco)

Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM, In Vitro S. A.) sin rojo fenol complementado con suero fetal bovino sin hormonas 10% (PAA), piruvato 1 mM (Gibco) y aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Gibco)

DMSO (Dimetilsulfóxido) 10%

TPA:79346, 12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato, Sigma Aldrich, 1 μ M en DMSO 10%.

FuGENE HD Transfection Reagent (Roche)

Proteína A-agarosa (Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent: sc-2003)

Buffer RIPA(Tris- HCl 50 mM (Baker), NaCl 150 mM (Baker), SDS 0.1 % (dodecilsulfato de sodio, BioRad) tritón x-100 1 %, (Sigma) con inhibidores: aprotinina 22 μ g/ml (Sigma), PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetil sulfonilo, Sigma), EDTA 1mM (ácido etilendiaminotetraacético, Sigma) y ortovanadato 1 mM (Sigma)

Tris (TBS): Tris base 0.05M, NaCl 0.15 M.

Buffer de Laemmli: Tris base (Baker) 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, Azul de bromofenol (Sigma), Glicerol (Sigma) 10%, 2-mercaptoetanol (BioRad) 5% Amortiguador Tris (TBS): Tris base 0.05M, NaCl 0.15 M.

Buffer PBS-EDTA: NaCl (Baker) 136.98 mM, KCl (Baker) 2.68 mM, KH₂PO₄ (Baker) 1.76 mM, Na₂HPO₄ (Baker) 1.44 mM, EDTA (Biorad) 1.27 mM.

Hoescht (Pierce* Hoechst 3342 Fluorescent Stain, Thermo Scientific)

Antifade (Fluoro Care Anti-Fade Mountant, Biocare Medical)

siRNAs

siRNA control : Control siRNA-I: sc-44237, Santa Cruz Biotechnology.

siRNA contra PKC α : PKC α siRNA (h): sc-36243, Santa Cruz Biotechnology.

siRNA contra PKC δ : PKC δ siRNA (h): sc-36253, Santa Cruz Biotechnology.

siRNA contra PKC ϵ : PKC ϵ siRNA (r): sc-270096, Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpos primarios

Para Western blot:

Anti-PKC α : PKC α (H-7): sc-8393, Santa Cruz Biotechnology; levantado en ratón.

Anti-PKC δ : PKC δ (C-17): sc-213, Santa Cruz Biotechnology; levantado en conejo.

Anti-PKC ϵ : PKC ϵ (17): sc-56944, Santa Cruz Biotechnology; levantado en ratón.

Anti- α -tubulina: α Tubulin (B-7): sc-5286, Santa Cruz Biotechnology; levantado en ratón.

Anti-RP: Anti-Progesterone Receptor antibody [N559] (ab58565), Abcam; levantado en ratón.

Para Western blot y citometría de flujo:

Anti p-S400 RP: Anti-Progesterone Receptor (phospho S400) antibody (ab60954), Abcam; levantado en conejo.

Para inmunofluorescencias:

Anti-RP: PR (C-20): sc-539, Santa Cruz Biotechnology; levantado en conejo.

Anticuerpos secundarios

Para Western blot:

Anti-ratón acoplado a peroxidasa: goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005, Santa Cruz Biotechnology.

Anti-conejo acoplado a peroxidasa: mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357, Santa Cruz Biotechnology.

Para inmunofluorescencias:

Anti-conejo acoplado a Alexa 594: Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Invitrogen.

Anti-ratón acoplado a FITC: goat anti-mouse IgG1-FITC: sc-2078, Santa Cruz Biotechnology.

Para citometría de flujo:

Anti-conejo acoplado a FITC: goat anti-rabbit IgG-FITC: sc-2012, Santa Cruz Biotechnology.

7.2 Cultivo Celular

La línea celular U373, derivada de astrocitomas humanos grado III, se cultivó en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con rojo fenol, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, en cajas Petri de 10 cm para los experimentos de coinmunoprecipitación, cajas de 6 pozos para los experimentos de transfección o cajas de 4 pozos para los experimentos de inmunofluorescencia hasta obtener una confluencia del 60% para los experimentos de transfección y de inmunofluorescencia o del 80% para los experimentos de

coimmunoprecipitación. Se incubaron a 37°C y CO₂ al 5%. Una vez obtenida dicha confluencia, el medio de cultivo se reemplazó por medio DMEM sin rojo fenol y suero fetal bovino al 10% libre de hormonas 24 horas antes de cada tratamiento.

7.3 Silenciamiento de PKC α , PKC δ y PKC ϵ

Se cultivaron las células U373 en cajas de 6 pozos como se mencionó en el apartado “7.2 *Cultivo celular*” hasta una confluencia del 60%.

Se preparó a una temperatura de 4°C una mezcla de 200 μ L de medio de transfección (DMEM sin rojo fenol, con antibiótico y libre de suero), 3 μ L del reactivo FuGENE HD Transfection Reagent para cada pozo; y para todos los pozos menos el Mock, que es el reactivo de transfección (FuGENE), se agregaron 0.5 ng de RNA de interferencia pequeño (siRNA) específico para silenciar PKC α , PKC δ ó PKC ϵ . Se utilizó un siRNA control, el cual es una secuencia aleatoria que no conlleva a la degradación específica de ningún mRNA conocido. La mezcla se dejó reposando durante 15 minutos a 4°C y posteriormente se vació en los pozos dejando incubar durante 72 horas a 37°C.

Para medir la eficacia del silenciamiento se llevó a cabo un Western blot (como se indica en el apartado “7.5 *Western blot*”) con las proteínas obtenidas de la lisis de las células transfectadas después de 72 horas, utilizando anticuerpos para detectar a las isoformas de PKC.

Se cambió el medio de las células transfectadas por DMEM sin rojo fenol y libre de suero 4 horas antes del experimento. Las células se trataron con TPA, el activador de PKCs (1 μ M en DMSO 10%) durante 5 min, a continuación, se colectaron con PBS-EDTA y se centrifugaron durante 4 min a 4,500 rpm a 4°C y se realizó una tinción intracelular para detectar la fosforilación en la Ser400 como se indica en el apartado “7.6 *Determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP en la Ser400 mediante citometría de flujo*”

7.4 Coinminuprecipitación

Se cultivaron las células U373 en cajas Petri de 10 cm como se mencionó en el apartado “7.2 *Cultivo Celular*”. Las células se trataron con TPA (1 μ M en DMSO 10%) durante 5, 10 y 60 min. En seguida, fueron recolectadas con PBS-EDTA y se lisaron por sonicación con buffer RIPA. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 15 min y se separó el sobrenadante. La concentración de proteína total se determinó espectrofotométricamente a 280 nm con el espectofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific).

Para inmunoprecipitar a PKC α y PKC δ , a 1 mg de proteína total se le añadieron 50 μ L de proteína A-agarosa y 2 μ g de anticuerpo anti PKC α o anti PKC δ . La mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 2 lavados del precipitado con buffer RIPA a 8000 rpm por 5 minutos cada uno a 4°C, finalmente, se agregaron 30 μ L de buffer de Laemmli.

Se realizó la técnica de Western blot, como se indica en el apartado “7.5 *Western blot*” con anticuerpos que reconocen específicamente al RP y al RP fosforilado en la Ser400 y se utilizó PKC α o PKC δ como control de carga según el caso para el análisis.

7.5 Western blot

Las células transfectadas fueron lisadas con buffer de Laemmli para realizar la extracción de proteínas.

Los lisados provenientes de la transfección o de la coimmunoprecipitación, se hirvieron durante 10 minutos y se centrifugaron por 15 minutos a 13,500 rpm a temperatura ambiente, y se cargaron 30 μ L del sobrenadante en geles de poliacrilamida al 7.5%.

Las proteínas se separaron por medio de electroforesis a 80 V por 2.5 horas. Se utilizaron Marcadores de peso molecular preteñidos para determinar el tamaño de las bandas.

Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa a 35 mA durante 7 horas para todas las proteínas (excepto tubulina) en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas se bloquearon toda la noche a 4°C con una solución rica en proteínas al 5% y albúmina al 3% en TBS-Tween 0.1% (TBS pH=7.4 + Tween al 0.1%). Las membranas se incubaron por 48 horas a 4°C con diferentes anticuerpos para detectar a las distintas proteínas: anticuerpo anti-RP o anti-pS400-RP en una concentración 4 µg/mL por 48 horas y anti-PKCα, anti-PKCδ o anti-PKCε en una concentración 0.666 µg/mL durante toda la noche. Después se lavaron con TBS-Tween 0.1% 3 veces durante 5 minutos, y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente, finalmente se realizaron nuevamente los lavados con TBS-Tween 0.1%.

Para los experimentos de coimmunoprecipitación se utilizó como control de carga el contenido de PKCα o PKCδ inmunoprecipitadas

Para los experimentos de silenciamiento, la transferencia se realizó a 35 mA durante 2 horas y se utilizó a la proteína α-tubulina como control de carga, ya que el contenido de ésta no se altera por los tratamientos.

Las membranas se trataron con glicina ácida para remover los anticuerpos anti-PKCα, anti-PKCδ y anti-PKCε y posteriormente se lavaron con TBS durante 20 min antes de ser bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0.1% durante toda la noche. Posteriormente se incubaron con anticuerpo anti-tubulina en una concentración de 0.2 µg/ml durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-Tween 0.1% y se colocó el anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa durante una hora. Posteriormente se realizaron los lavados de la manera antes mencionada.

La identificación de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia y se reveló por autoradiografía.

Cada placa se sometió a un análisis densitométrico con el programa Chemilmager para poder semicuantificar las bandas de las proteínas.

Los resultados se normalizaron con respecto a su control. PKC α , PKC δ , PKC ϵ . Para las muestras provenientes de la coimmunoprecipitación, se utilizaron PKC α , PKC δ , PKC ϵ según correspondiera, y para las muestras provenientes de la transfección se utilizó α -tubulina.

7.6 Determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP en la Ser400 mediante citometría de flujo.

Las células se trataron como se menciona en el apartado “7.3 Silenciamiento de PKC α , PKC δ y PKC ϵ ”.

Posteriormente, las células se resuspendieron en PBS con SFB al 4% (PSF). Se añadió paraformaldehído al 2% para fijar las células y se incubó por 10 minutos a 37°C. Se añadió 1 mL de metanol frío y se incubó durante 30 minutos a 4°C para aumentar la permeabilidad de las células. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 4500 rpm por 4 minutos, y se resuspendieron las células en PSF y se realizó un lavado centrifugando a 4500 rpm por 4 minutos. Se resuspendieron las células en 150 μ L de PSF, y cada tubo se dividió en 3:

A-Células sin teñir, a las cuales no se les añadieron anticuerpos y fueron guardadas directamente a -20°C. Las cuales fueron útiles para medir la autofluorescencia de las células.

B- Células + Anticuerpo secundario. Las cuales fueron útiles para medir la unión no específica del anticuerpo secundario.

C- Células + Anticuerpo primario + Anticuerpo secundario. A partir de las cuales se midió la unión del anticuerpo primario a la proteína de interés.

Al grupo C, se le agregó el anticuerpo primario anti-pSer400-RP (detecta al RP fosforilado en la Ser400) en una concentración final de 5 μ g/mL PSF y se

incubó durante 20 minutos, se añadió 1 mL de PSF y se centrifugó a 1400 rpm por 4 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 50 µL de PSF.

Al grupo B y C se les agregó el anticuerpo secundario acoplado a FITC en una concentración final de 2 µg/mL PSF, y se incubó durante 20 minutos en oscuridad, se realizó un lavado añadiendo 500 µL de PSF y centrifugando a 1400 rpm por 4 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 200 µL de PSF.

Se llevó a cabo la lectura de la fluorescencia de las células a través de un citómetro FACS Calibur (BD, Biosciences).

Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo v8.7

7.7 Localización de PKC α y RP

Las células U373 se cultivaron en cajas Petri de 10 cm como se mencionó en el apartado “7.2 Cultivo Celular”. Las células se trataron con TPA (1 µM en DMSO 10%) durante 5, 10 y 60 min. En seguida, se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente se permeabilizó la membrana celular con metanol al 100% durante 6 minutos a –20°C y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. A continuación se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS durante una hora a 37°C. Finalmente se agregó el anticuerpo primario: anti-RPy anti-PKC α en una concentración de 8 mg/mL para el RP y 2mg/mL para PKC α , en PBS con BSA al 0.5% y suero normal de cabra al 5% y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche y al finalizar se realizaron 3 lavados.

Los siguientes pasos se realizaron en condiciones de oscuridad:

Se agregó el anticuerpo secundario para el RP y para PKC α en una concentración de 2 mg/mL en PBS con BSA al 1% y se incubaron durante 40 minutos; al finalizar se realizaron 3 lavados. A continuación, para teñir los núcleos se agregó Hoescht durante 7 minutos en una concentración de 24.6 µg/mL y se

realizaron 3 lavados con agua. Posteriormente la muestra se montó con antifade y se observó con el microscopio de fluorescencia.

7.8 Análisis de resultados

Los resultados son expresados como media \pm E.S., la n de cada experimento se indica en la figura correspondiente.

Finalmente se realizó el análisis estadístico utilizando una ANOVA seguida de una prueba de Dunnet utilizando una $p < 0.05$ para considerar diferencias significativas.

8. Resultados

8.1 Silenciamiento de PKC α , PKC δ y PKC ϵ

Se inhibió la expresión de las isoformas α , δ y ϵ de las PKCs en células U373 mediante siRNAs. Como controles del procedimiento se trató a las células con un siRNA que no tiene un ARNm blanco y con Mock que es el reactivo de transfección, para verificar si éste podría estar afectando a las células.

A fin de probar que las 3 isoformas se hubieran silenciado en la misma proporción, se realizó un Western blot para medir la expresión de cada una de las isoformas de PKC y se comparó con las células tratadas con el siRNA control y con el Mock.

La figura 8 muestra el análisis densitométrico obtenido a partir del Western blot, donde se observa que entre el siRNA control y el Mock no existen cambios en la expresión de las isoformas de PKC, es decir, ni los reactivos de la transfección ni el proceso en sí influyen en la expresión de las isoformas de PKC. Al silenciar las isoformas de PKC, se observó una disminución en la expresión del 76% para

PKC α , 82% para PKC δ y 78% para PKC ϵ . Es decir, las 3 isoformas se silencian en la misma proporción, lo cual nos permitió asegurar que las diferencias obtenidas por el silenciamiento de las PKCs no subestimarían ni sobrestimarían los datos obtenidos al medir la fosforilación del RP.

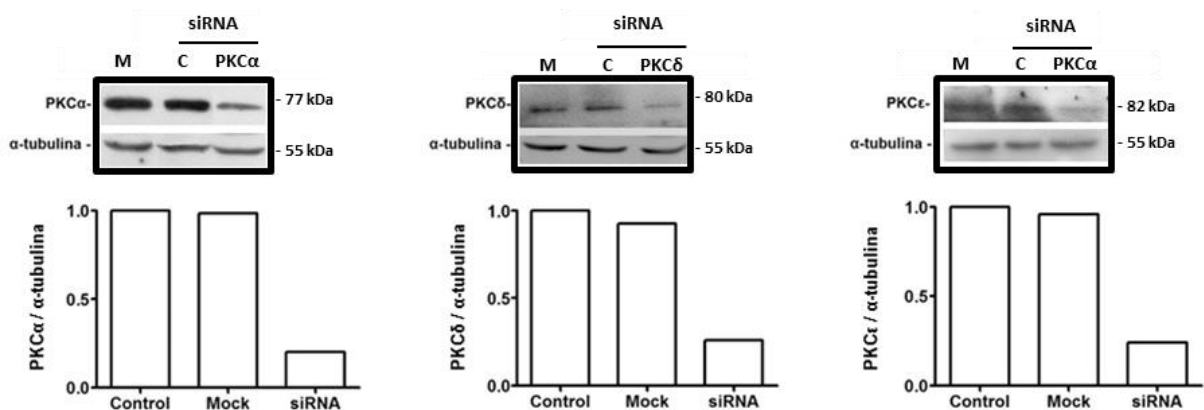


Figura 8. Silenciamiento de PKC α , PKC δ y PKC ϵ . Las células U373 se trataron con siRNA control (secuencia aleatoria que no silencia ningún ARNm) Mock (reactivo de transfección), y siRNA contra PKC α , PKC δ y PKC ϵ . En la parte superior, se muestran los Western blot representativos de 2 experimentos independientes y en la parte inferior las densitometrías correspondientes al promedio de cada isoforma de PKC, a partir de 2 experimentos independientes.

8.2 Determinación de las isoformas de PKC que participan en la fosforilación del RP en la Ser400

En experimentos anteriores realizados en el laboratorio, se observó que al activar PKCs con TPA, la fosforilación en la Ser400 del RP incrementó a los 5 minutos.

El TPA interactúa con el mismo sitio de unión que el DAG, por lo tanto, es un activador de las PKCs clásicas y nuevas, esto impide identificar a las isoformas que participan en la fosforilación el RP.

Para determinar cuáles isoformas de PKC participaban en la fosforilación del RP, las células transfectadas con siRNAs contra PKC α , PKC δ ó PKC ϵ se trataron

con TPA durante 5 minutos y se determinó el contenido del RP fosforilado en la Ser400 mediante citometría de flujo.

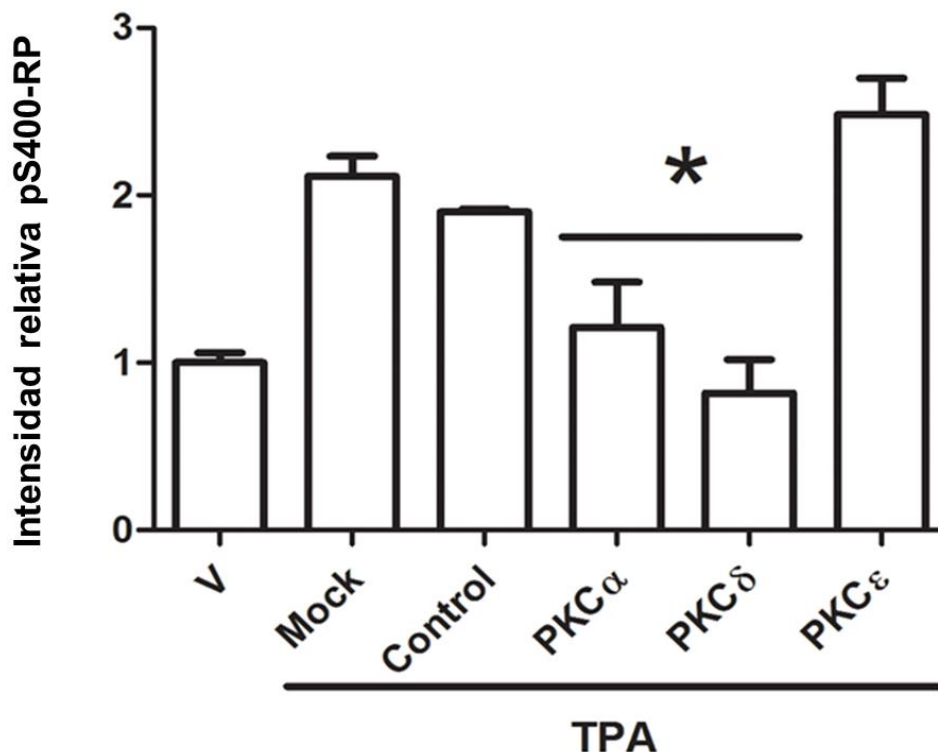


Figura 9. PKC α y PKC δ participan en la fosforilación del RP en la serina 400. Las células U373 fueron transfectadas con ARNs de interferencia (siRNA) contra las isoformas de PKC α , δ y ϵ . Las células transfectadas fueron tratadas con TPA 1 μ M por 5 minutos y fueron recolectadas y fijadas. Vehículo (V): células sin transfectar tratadas con DMSO. Mock: células tratadas únicamente con el reactivo de transfección sin siRNA, Control: células transfectadas con un siRNA aleatorio que no silencia a ningún ARNm. Se muestra el análisis estadístico para el contenido de RP fosforilado en Ser400 (pS400-RP) determinado mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos para pS400-RP fueron normalizados a 1 con respecto al vehículo. Las barras representan la media \pm E.S. n=3 *p<0.05 vs. Control, Mock y PKC ϵ .

Como se muestra en la figura 9, después del tratamiento con TPA durante 5 minutos, se observa un aumento en el contenido del RP fosforilado en la Ser400 en las células transfectadas con Mock y siRNA control, comparados con las células tratadas con el vehículo. Este aumento coincide con los experimentos previamente

realizados en el laboratorio, donde después de 5 minutos de tratamiento con TPA, aumenta la fosforilación en la Ser400 del RP.

Al silenciar a las isoformas α y δ de PKC, el incremento en la fosforilación del RP en la Ser400 inducido por TPA fue bloqueado, sin embargo el silenciamiento de PKC ϵ no tuvo efecto sobre la fosforilación del RP inducida por TPA.

Los resultados anteriores demuestran que PKC α y PKC δ participan en la fosforilación del RP en la Ser400 inducida por TPA.

8.3 Asociación de PKC α y PKC δ con las isoformas del RP

Ya que PKC α y PKC δ eran las isoformas que participaban en la fosforilación del receptor en la Ser400, entonces se buscó si había asociación de estas cinasas con las isoformas del RP. Se trataron a las células U373 con TPA 1 μ M durante 5, 10 ó 60 minutos; se inmunoprecipitaron PKC α y PKC δ y mediante la técnica de Western Blot se buscó el contenido de las isoformas del RP total y de sus isoformas fosforiladas en la Ser400.

En el panel A de la figura 10 se observa que existe una asociación basal de PKC α con RP-A y RP-B. La asociación de RP-B con PKC α aumentó a los 5 minutos del tratamiento con TPA, lo cual coincide con experimentos anteriores realizados en el laboratorio donde la máxima fosforilación del RP en la Ser400 por PKC se observó a los 5 minutos de tratamiento con TPA; sin embargo, la asociación de RP-A con PKC α incrementó desde los 5 minutos y se mantuvo hasta los 60 minutos después del tratamiento con TPA.

En el panel B de la figura 10 se observa una asociación basal de PKC δ con RP-B y un aumento gradual con respecto al tiempo de tratamiento con TPA, el cual fue significativo hasta los 60 minutos; sin embargo, no se observó asociación con RP-A.

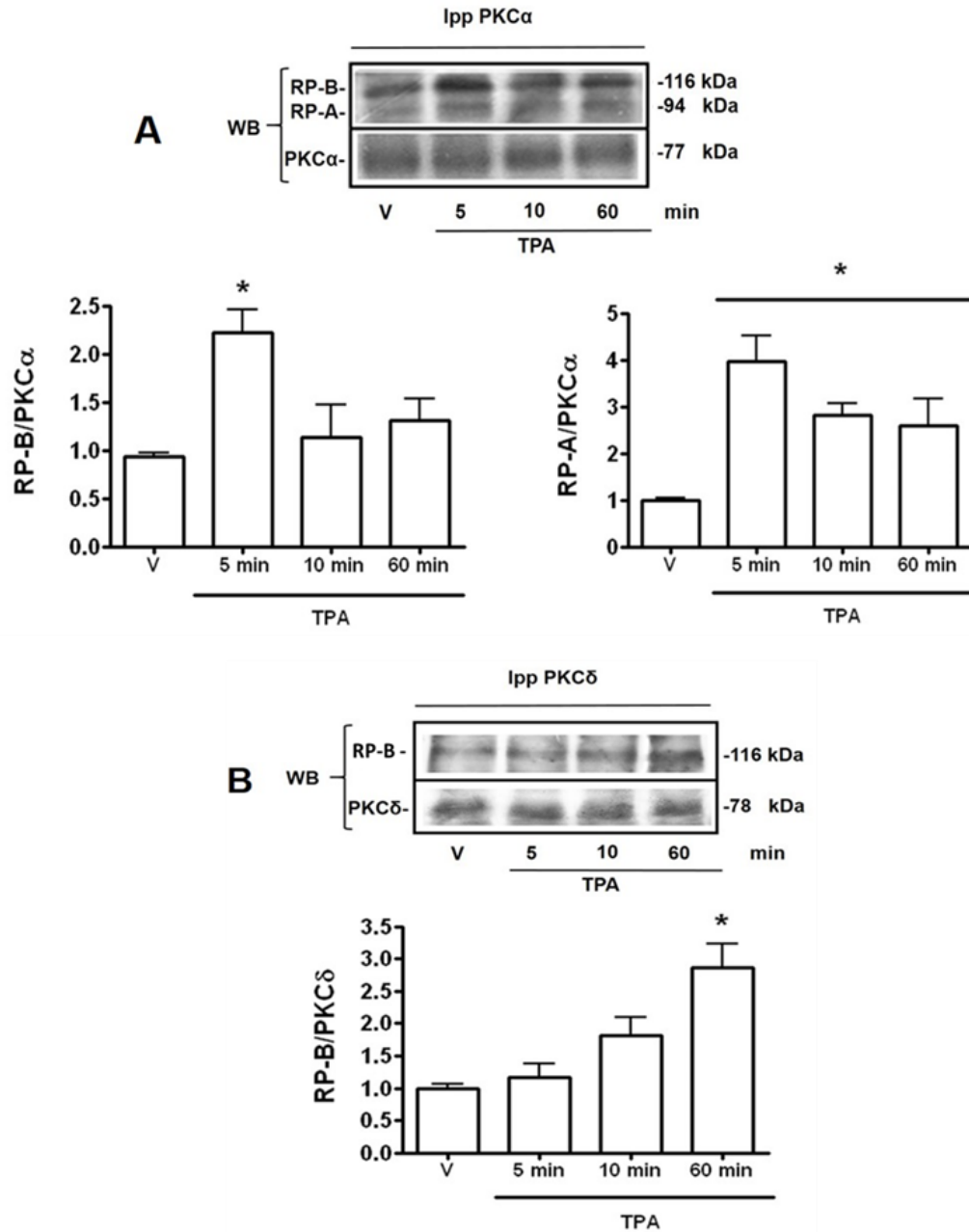


Figura 10. Asociación de PKC α y δ con las isoformas del RP. Las células U373 fueron tratadas con vehículo (DMSO 10%) (V) y TPA por 5, 10 y 60 min. Las proteínas totales fueron extraídas de los lisados celulares. PKC α y PKC δ fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo correspondiente. Los paneles superiores de A y B muestran un Western Blot representativo de 4 experimentos en donde se observan las isoformas del RP que coimmunoprecipitaron con PKC α y PKC δ . Los paneles inferiores de A y B muestran el análisis estadístico para el contenido de RP-B y RP-A relativo al contenido de PKC α o PKC δ . Los resultados obtenidos para cada una de las isoformas fueron normalizados a 1 con respecto al vehículo. Las barras representan la media \pm E.S. n=4 *p<0.05 vs. vehículo.

8.4 Asociación de PKC α y PKC δ con las isoformas del RP fosforiladas en la Ser400

A fin de buscar si la asociación observada entre las isoformas de PKC con las isoformas de RP se debía a una asociación con el residuo Ser400 de éste, se realizó una coimmunoprecipitación de PKC α y δ y se buscó al RP fosforilado en la Ser400 mediante la técnica de Western blot.

En el panel A de la figura 11 se presenta la asociación de PKC α con las isoformas A y B del RP fosforiladas en la Ser400, se observó una asociación basal, la cual para RP-B aumentó a los 5 minutos de tratamiento con TPA, y posteriormente regresó a su estado basal.

Para RP-A se observa también una asociación basal, sin embargo ésta no aumentó con el tratamiento con TPA.

En el panel B de la figura 11 se presenta la asociación de PKC δ con el RP-B fosforilado en la Ser400. Se observa una asociación basal, la cual aumenta hasta los 60 minutos de tratamiento con TPA. Sin embargo, no se observó asociación con RP-A fosforilada en la Ser400.

8.5 Localización de PKC α y RP

Ya que PKC α fue la isoforma que se asoció con el RP-B en la Ser400 a los 5 minutos, entonces se determinó la localización de ambas proteínas en la células células U373 después del tratamiento con TPA.

En el panel A de la figura 12 se muestra la localización de PKC α y el RP después del tratamiento con el vehículo. Se puede observar que el RP (rojo) y PKC α (verde) tienen una localización tanto citoplasmática como nuclear. Al realizar el empalme (turquesa) de la imagen de PKC α (verde) con la imagen de los núcleos celulares (azul), se puede observar que PKC α se encuentra tanto en citoplasma como en núcleo.

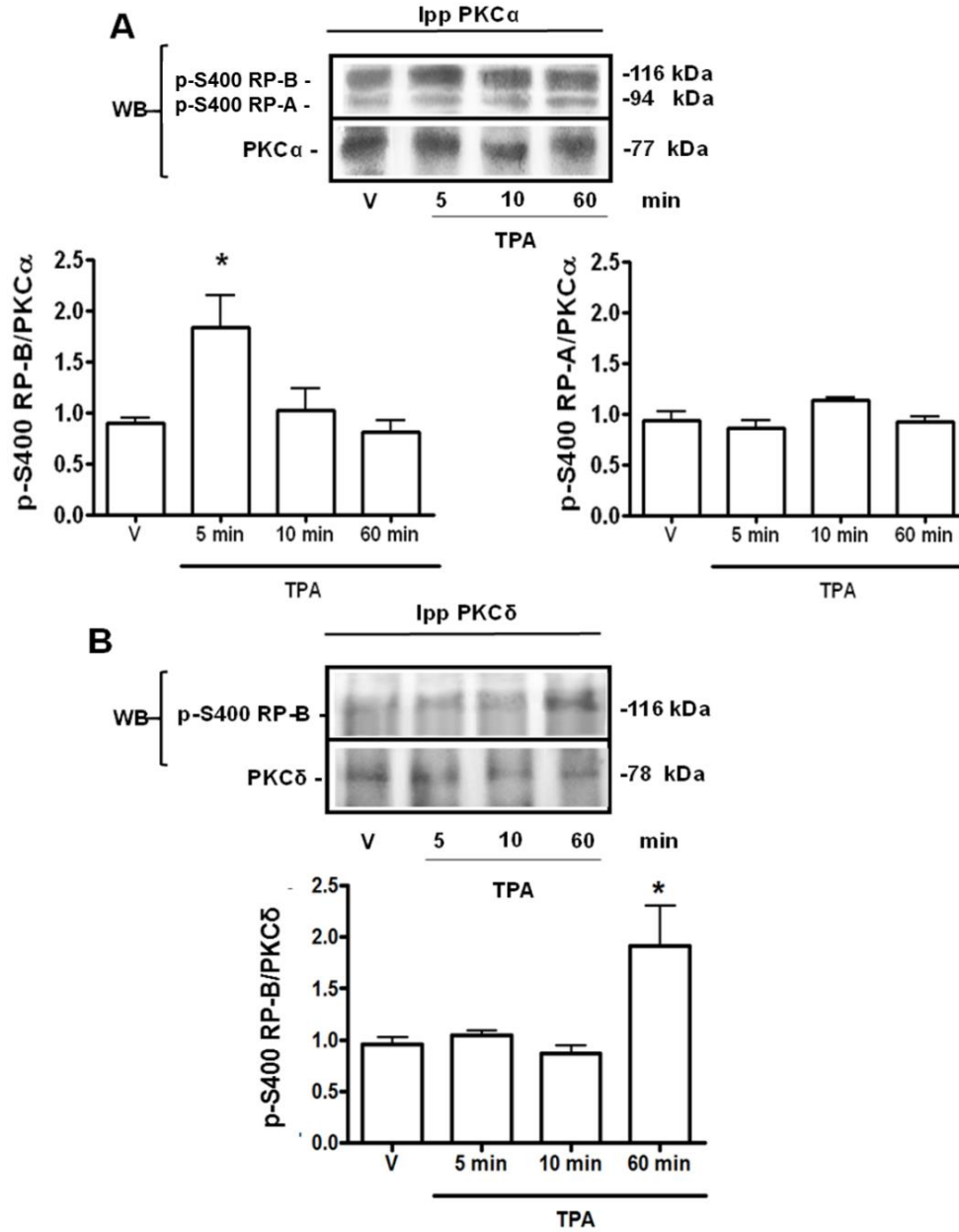


Figura 11. Asociación de PKC α y δ con las isoformas del RP en la Ser400. Las células U373 fueron tratadas con vehículo (DMSO 10%) (V) y TPA por 5, 10 y 60 min. Las proteínas totales fueron extraídas de los lisados celulares. PKC α y δ fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo correspondiente. Los paneles superiores de A y B muestran un Western blot representativo de las isoformas del RP fosforiladas en la Ser400 (p-S400 RP) que coimmunoprecipitaron con PKC α y δ . Los paneles inferiores de A y B muestran el análisis estadístico para el contenido de las isoformas p-S400 RP-B y p-S400 RP-A relativo al contenido de PKC α o PKC δ . Los resultados obtenidos para cada una de las isoformas fueron normalizados a 1 con respecto al vehículo. Las barras representan la media \pm E.S. n=4 *p<0.05 vs.vehículo.

Al observar el empalme (naranja) de la imagen de PKC α (verde) con la imagen del RP (rojo), podemos observar que colocalizan tanto en el citoplasma como en el núcleo.

En el panel B de la figura 12 se muestra la localización de PKC α (verde) y el RP (rojo) tras el tratamiento con TPA durante 5 minutos. En esta imagen podemos observar un aumento en la localización nuclear de PKC α . Se puede observar que al realizar el empalme (turquesa) de la imagen de PKC α (verde) con la imagen de los núcleos celulares (azul), existe colocalización en el núcleo.

Al observar el empalme (naranja) de la imagen de PKC α (verde) con la imagen del RP (rojo), podemos observar que colocalizan principalmente en el espacio perinuclear y en algunas zonas en el núcleo.

Figura 12. Localización intracelular de RP y PKC α . Panel A: Células U373 tratadas con vehículo (DMSO 10%). Panel B: Células U373 tratadas con TPA por 5 min. Después de los tratamientos con el vehículo o con TPA, las células U373 fueron teñidas para inmunofluorescencia. Las células fueron incubadas con anticuerpos anti-RP y anti-PKC α , seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a FITC(se detecta en color verde) y a ALEXA 594 (se detecta en color rojo) respectivamente. PKC α se muestra en verde y el RP en rojo. Hoescht fue usado para la tinción nuclear (se detecta en color azul). En los paneles inferiores de A y B se muestra el empalme de la imagen de PKC α con la imagen de los núcleos, donde las áreas de colocalización se muestran en turquesa. Para el empalme de la imagen de PKC α y la imagen del RP, las áreas de colocalización se muestran en naranja.

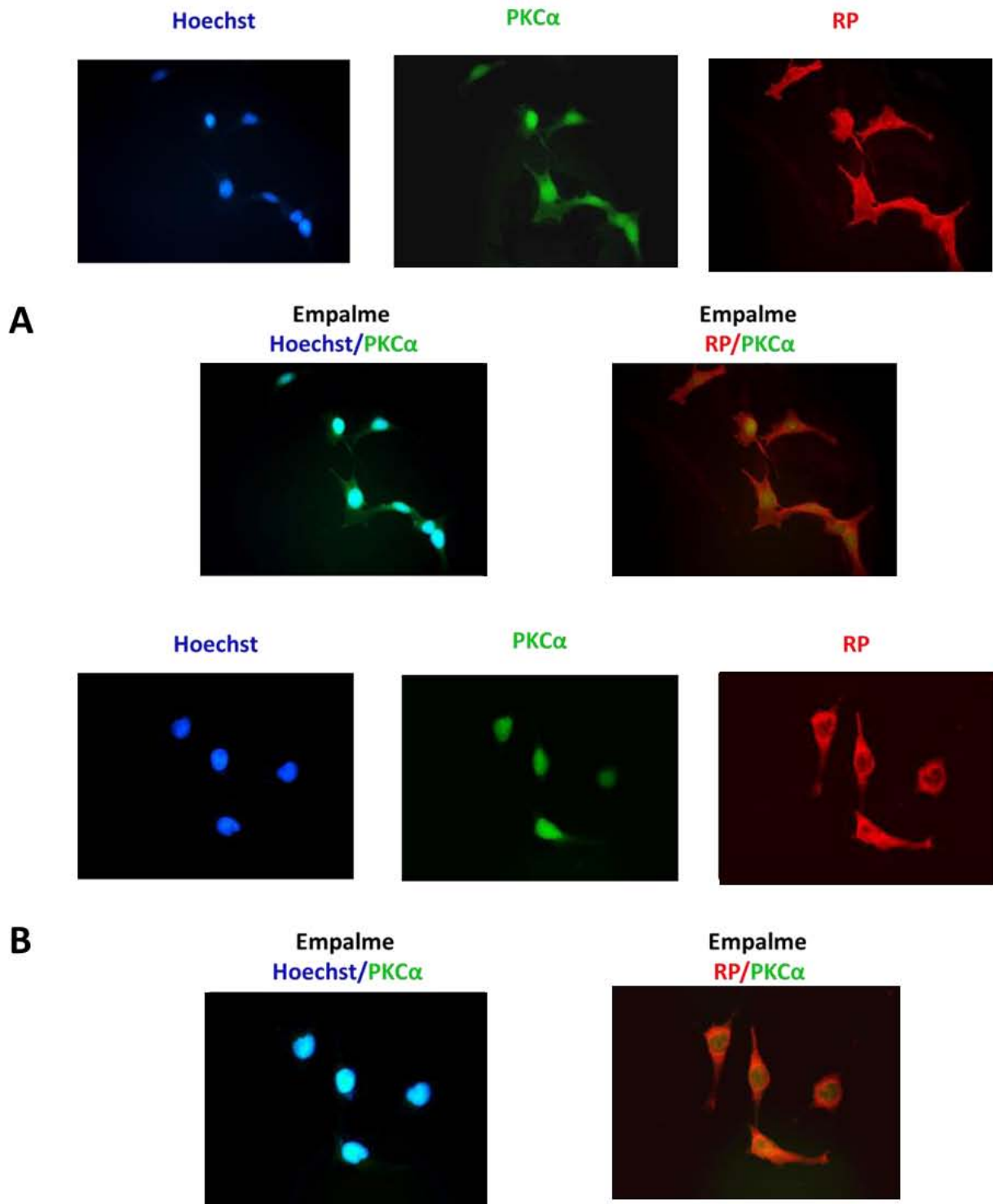


Figura 12. Ver pie de figura en página 42

9. Discusión

En el presente trabajo se estudió el papel de PKC α y δ en la fosforilación de las isoformas del RP en el residuo Ser400 en células U373 derivadas de un astrocitoma humano grado III.

La fosforilación del RP regula su localización intracelular, la formación de complejos proteicos y su actividad transcripcional además de marcarlo para su degradación por la vía del proteosoma 26S.

Hasta el momento, se ha encontrado que el RP puede ser fosforilado en 15 sitios por la CK2, la CDK-2 y por las MAPK-44 y MAPK-42. Recientemente, el grupo de Wang identificó la fosforilación del RP-A en la Ser394 por la GSK-3 β .

La fosforilación de algunos de estos sitios y sus efectos ya ha sido bien estudiados. La fosforilación de la Ser294 por MAPK conlleva a la translocación nuclear, eleva su actividad transcripcional, y aumenta su degradación. La fosforilación del residuo Ser345 aumenta su actividad transcripcional y facilita la unión del RP a sitios SP1 de los genes p21 y EGFR.

PKC es una proteína relacionada con procesos de malignidad y se sabe que en modelos de gliomas se han asociado a procesos invasivos y apoptóticos así como al aumento en la expresión de oncogenes.

En experimentos previamente realizados en el laboratorio, a través del programa KinasePhos, se identificó que PKC puede fosforilar al RP en dos posibles residuos, Ser400 y Thr430. Lo anterior se demostró en células U373, al observar que al activar PKCs con TPA, aumenta la fosforilación en el residuo Ser400 del RP. Este aumento es significativo a los 5 minutos de tratamiento con TPA; sin embargo se desconocía que isoformas de PKC estarían implicadas en el proceso de fosforilación del RP.

Al silenciar a las isoformas α , δ y ϵ de PKC, las cuales habían sido detectadas previamente en la línea celular U373, se identificó que PKC α y PKC δ participan en la fosforilación del RP en la Ser400.

Sin embargo, no se sabía si estas cinasas podían asociarse con las isoformas del RP.

Se observó que existe una asociación basal de PKC α con RP-A y RP-B. La asociación de RP-B con PKC α aumentó a los 5 minutos del tratamiento con TPA y la asociación de RP-A con PKC α se observó desde los 5 hasta los 60 minutos después del tratamiento con TPA, lo cual nos sugiere una cinética de asociación diferente para cada isoforma de RP con PKC α .

Para la asociación del RP-B fosforilado en la Ser400 con PKC α , se observó la misma dinámica de asociación que con el RP total. Lo anterior comprueba que la asociación de PKC α con el RP-B resulta en la fosforilación de la Ser400.

Para el RP-A fosforilado en la Ser400 se observa una asociación basal con PKC α , sin embargo ésta no aumentó con el tratamiento con TPA, lo cual coincidía con los resultados obtenidos para la asociación de PKC α con el RP-A total, la cual aumentó después del tratamiento con TPA. Estos resultados sugieren que PKC α podría estar fosforilando al RP-A en un residuo diferente a la Ser400, probablemente en Thr430, como se analizó *in silico* con el programa KinasePhos.

En experimentos anteriores realizados por Clemm et al., se determinó que las isoformas del RP tienen diferentes patrones de fosforilación, como en células T47D donde el RP-A es un sustrato pobre para la fosforilación en el residuo Ser294 cuando se compara con RP-B. Un efecto similar podría estar sucediendo en el caso de la Ser400 y nuestra línea celular U373.

El anticuerpo utilizado para identificar al RP mediante citometría de flujo no es capaz de discernir entre RP-A y RP-B, ya que la Ser400 es un residuo común para ambas isoformas. Sin embargo, después de realizar los experimentos de coimmunoprecipitación es claro que la asociación que incrementa después del

tratamiento con TPA es la que ocurre entre el RP-B fosforilado y PKC α . Lo cual nos indica que el aumento en la fosforilación del RP en la Ser400 a los 5 minutos de tratamiento con TPA, se debe a la fosforilación en el RP-B y que este efecto depende de PKC α .

El modelo de asociación propuesto para PKC α con las isoformas del RP se presenta en la figura 13.

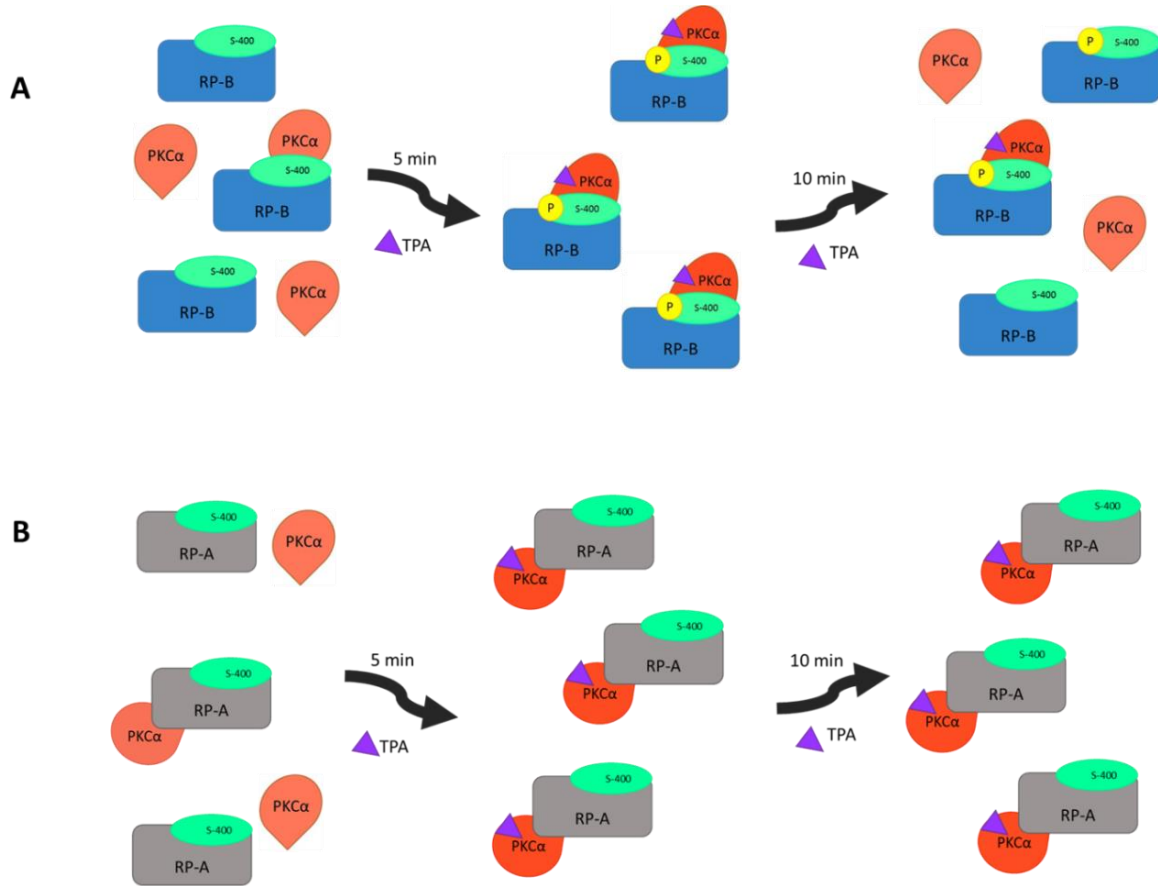


Figura 13. Asociación de PKC α con las isoformas del RP. Panel A: PKC α tiene una asociación basal con el RP-B fosforilado en el residuo Ser400, la cual aumenta a los 5 min de activación de la activación de PKC α por el tratamiento con TPA; esta asociación regresa a su estado basal a los 10 min. Panel B: PKC α tiene una asociación basal con el RP-A, la cual aumenta desde los 5 minutos después de la activación de PKC α con TPA. Panel B: PKC α se asocia con el RP-A en un residuo diferente a la Ser400. PKC: proteína cinasa C, RP: receptor a progesterona, S-400: residuo serina 400 del RP, TPA:12 -O- Tetradeconoilforbol -13- acetato, activador de PKC.

PKC δ tuvo una asociación basal con el RP-B, la cual aumentó significativamente hasta los 60 minutos de tratamiento con TPA. Esta dinámica de asociación coincide con el RP-B fosforilado en la Ser400.

Como se observó en la figura 9, PKC δ está involucrada en la fosforilación del RP, teniendo un efecto a los 5 minutos de tratamiento con TPA, sin embargo este tiempo no coincide con el observado en la asociación de PKC δ con RP-B y RP-B fosforilado en la Ser400, lo cual nos puede sugerir que otra vía de señalización está involucrada en la fosforilación de este residuo.

Se sabe que PKC δ es capaz de activar otras vías de señalización como la de MAPK, lo cual induce la proliferación del factor de crecimiento fibroblástico básico en células de músculo liso (Rorowski et al., 2005). A través del programa KinasePhos, también se determinó que MAPK podría fosforilar al RP en la Ser400, lo anterior sugiere que PKC δ podría activar a MAPK y ésta fosforilar al RP en la Ser400.

El aumento en la asociación de PKC δ con el RP-B y el RP-B fosforilado en la Ser400, a los 60 minutos de tratamiento con TPA, podría explicarse por la interacción del RP con la tirosina cinasa, c-Src. Se ha reportado que el RP, a través de su dominio rico en prolina puede unirse al dominio SH3 de c-Src. Como consecuencia de esta unión, el RP activa a c-Src, resultando en el reclutamiento y activación de proteínas de la vía de MAPK. (Boonyaratanakornkit et al., 2001, Miagliaccio et al., 1998) Además, se sabe que c-Src es también capaz de activar a PKC δ (Rybin et al., 2007). Esto fue confirmado por Kajimoto y colaboradores quienes reportaron que PKC δ puede ser activada por un mecanismo dependiente de c-Src en el núcleo. Por lo tanto se sugiere que la asociación de PKC δ con el RP, se debe a una asociación del RP con c-Src y de ésta con PKC δ .

El modelo de asociación sugerido para PKC δ con el RP-B se presenta en la figura 14.

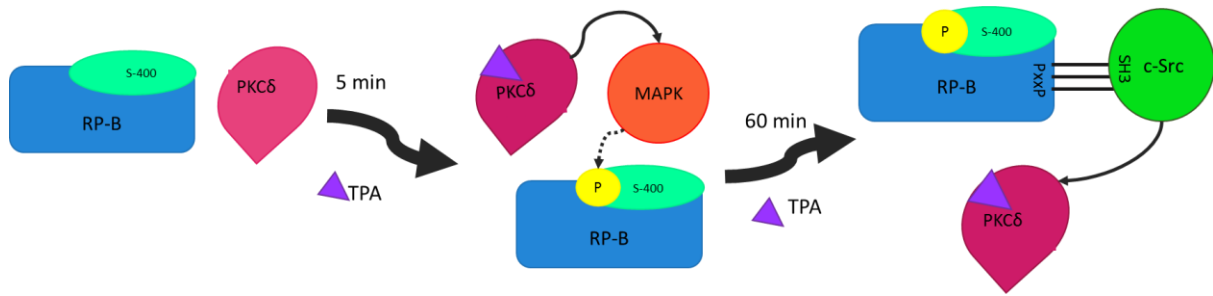


Figura 14. Asociación de PKCδ con RP-B. A los 5 min de tratamiento con TPA, PKCδ activa a MAPK, y ésta fosforila al RP en Ser400. A los 60 min de tratamiento con TPA, RP-B se asocia con c-Src, la cual activa a PKCδ. MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos, PxxP: dominio rico en prolina, PKC: proteína cinasa C, RP: receptor a progesterona, S-400: residuo serina 400 del RP, TPA:12 -O- Tetradecanoilforbol -13- acetato, activador de PKC.

A fin de determinar la localización intracelular de PKCα y del RP, se realizó una inmunofluorescencia para identificar a ambas proteínas.

Se puede observar que en el tratamiento con el vehículo, PKCα tiene una localización citoplasmática y el RP tiene una localización tanto citoplasmática como nuclear. En la literatura se ha reportado que RP-B está distribuido en el citoplasma y el núcleo, mientras que RP-A es predominantemente nuclear (Boonyaratanakornkit et al., 2007 y Lim et al., 1999). El anticuerpo utilizado en este estudio reconoce al RP total (no distingue isoformas) por lo que detecta a las poblaciones del RP tanto en citoplasma como en núcleo.

PKCα y RP colocalizan tanto en citoplasma como en núcleo, lo cual coincide con los experimentos de coimmunoprecitación, se puede observar que ambas isoformas del RP tienen una asociación basal con PKCα.

Al activar PKCα con TPA durante 5 minutos, podemos observar un notable aumento en la localización nuclear de PKCα. Lo anterior sugiere que PKCα migra al núcleo tras la activación con TPA. La localización del RP se mantiene en núcleo y citoplasma.

PKC α y el RP colocalizan en algunas zonas del núcleo y principalmente, en el espacio perinuclear, lo cual sugiere que el evento de fosforilación del RP por PKC α podría ocurrir en el espacio perinuclear.

Otro aspecto importante que se observa en todos los resultados, es que el RP es fosforilado aún en ausencia de ligando, lo que aumenta su importancia como factor de transcripción en condiciones fisiológicas y patológicas, ya que podría ser activado por una gran variedad de vías de señalización.

Aunque típicamente las PKCs clásicas y nuevas se activan por los productos de la fosfolipasa C (PLC) (el DAG e inositol trifosfato (IP3), que aumenta el Ca²⁺ intracelular), las PKCs pueden activarse por otros mecanismos como la fosforilación y participar en una gran diversidad de vías de señalización. Con los resultados obtenidos en este trabajo, se demuestra una relación entre la actividad de PKC y el RP, por lo que este receptor podría activarse por mecanismos no contemplados en sus vías de activación canónica.

El papel de la fosforilación del RP por PKC contribuye a entender los mecanismos por los cuales se regula la activación, degradación y actividad transcripcional del RP en estas células tumorales. Lo anterior resulta de gran importancia para el estudio de nuevos blancos terapéuticos para este y otros tipos de cáncer donde el RP juegue un papel en la proliferación del tumor.

10. Conclusiones

En células U373, las isoformas PKC α y δ participan en la fosforilación del RP en el residuo Ser400.

PKC α tiene una asociación basal con el RP-B y el RP-B fosforilado en la Ser400, y ésta se incrementa a los 5 minutos de tratamiento con TPA.

PKC α tiene una asociación basal con el RP-A total y se incrementa desde los 5 hasta los 60 minutos del tratamiento con TPA, no así para el RP-A fosforilado en el residuo Ser400.

PKC α colocaliza con el RP en citoplasma y en núcleo.

PKC α migra al núcleo al ser activada por TPA.

PKC δ tiene una asociación basal con el RP-B y RP-B fosforilado en la Ser400, y ésta se incrementa a los 5 minutos de tratamiento con TPA.

PKC δ no se asocia con el RP-A.

11. Perspectivas

-Determinar los efectos de la fosforilación del RP por PKC α y PKC δ en la proliferación celular, migración, invasividad y apoptosis.

-Determinar los genes que se transcriben al fosforilar el RP por PKC.

-Determinar la participación de la vía de MAPK con PKC en la fosforilación de las isoformas del RP.

-Determinar el papel de PKC en la fosforilación del RP en el residuo Thr430

-Determinar la interacción de PKC δ con proteínas como c-Src.

12. Referencias

- Abdel-Hafiz, H., Takimoto, G. S., Tung, L. & Horwitz, K. B. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J. Biol. Chem.***277**, 33950–6 (2002).
- Aziz, M. H. *et al.* Protein kinase C ϵ mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression, and cell invasion in various human cancer cell lines through integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2). *Oncogene* **29**, 3100–3109 (2010).
- Beck, C. A., Weigel, N. L. & Edwards, D. P. Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol***6**, 607–620 (1992).
- Beyenburg, S. *et al.* Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Res.***44**, 141–153 (2001).
- Boonyaratankornkit, V. *et al.* The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol. Endocrinol. Balt. Md***21**, 359–75 (2007).
- Boyle, D. M. & Van Der Walt, L. A. Enhanced phosphorylation of progesterone receptor by protein kinase C in human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem.***30**, 239–244 (1988).
- Bristol, R. E. Low-grade glial tumors: are they all the same? *Semin. Pediatr. Neurol.***16**, 23–26 (2009).
- Cabrera-Muñoz, E., Fuentes-Romero, L. L., Zamora-Chávez, J., Camacho-Arroyo, I. & Soto-Ramírez, L. E. Effects of progesterone on the content of CCR5 and CXCR4 coreceptors in PBMCs of seropositive and exposed but uninfected Mexican women to HIV-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.***132**, 66–72 (2012).
- Cabrera-Munoz, E., Gonzalez-Arenas, A., Saqui-Salces, M., Camacho, J., Larrea, F., Garcia-Becerra, R. & Camacho-Arroyo I. Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **113**, 80-4 (2009).
- Cabrera-Muñoz, E., Hernández-Hernández, O. T. & Camacho-Arroyo, I. Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr. Top. Med. Chem.***11**, 1663–1667 (2011).

Callier, S., Morissette M., Grandbois M., Pelaprat D. & Di Paolo T. Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse*. **41**, 131-8 (2001).

Camacho-Arroyo, I., Cabrera-Muño, E. & Hernández-Hernández, O.T. Regulation of sex hormone receptors and their coactivators in human astrocytoma cells. *Advances in Selected Topics in Endocrinology*.171-185 (2009).

Camacho-Arroyo, I., Mendez-Cruz, S. T., Guerra-Araiza, C. & Cerbon, M. A. Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J Endocrinol***157**, 71–74 (1998).

Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A. M. & Cerbon, M. A. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett***214**, 25–28 (1996).

Camacho-Arroyo, I., Pasapera A.M., Perez-Palacio G. & Cerbon M.A. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Invest Clin*. **47**, 329-40 (1995).

Camacho-Arroyo, I., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A. & Guerra-Araiza, C. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology***76**, 267–271 (2002).

Carbajo, P., Christensen, K., Edwards, D. P. & Skafar, D. F. Binding of [3H]progesterone to the human progesterone receptor: differences between individual and mixed isoforms. *Endocrinology***137**, 2339–2346 (1996).

Clemm, D. L. *et al.* Differential hormone-dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol. Balt. Md***14**, 52–65 (2000).

Conneely, O. M. & Jericevic B.M. Progesterone regulation of reproductive function through functionally distinct progesterone receptor isoforms. *Rev Endocr Metab Disord*. **3**, 201-9 (2002).

Conneely, O. M., Kettelberger, D. M., Tsai, M. J., Schrader, W. T. & O'Malley, B. W. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J. Biol. Chem.***264**, 14062–14064 (1989).

- Daniel, A. R. *et al.* Linkage of progestin and epidermal growth factor signaling: phosphorylation of progesterone receptors mediates transcriptional hypersensitivity and increased ligand-independent breast cancer cell growth. *Steroids***72**, 188–201 (2007).
- Daniel, A. R., Knutson, T. P. & Lange, C. a. Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. *Mol. Cell. Endocrinol.***308**, 47–52 (2009).
- Denner, L. A., Weigel, N. L., Maxwell, B. L., Schrader, W. T. & O'Malley, B. W. Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science***250**, 1740–1743 (1990).
- Denning, M. F., Dlugosz, A. A., Threadgill, D. W., Magnuson, T. & Yuspa, S. H. Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J. Biol. Chem.***271**, 5325–5331 (1996).
- Dressing, G. E., Hagan, C. R., Knutson, T. P., Daniel, A. R. & Lange, C. a. Progesterone receptors act as sensors for mitogenic protein kinases in breast cancer models. *Endocr. Relat. Cancer***16**, 351–61 (2009).
- Engel, S. R., Purdy, R. H. & Grant, K. A. Characterization of discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone. *J Pharmacol Exp Ther***297**, 489–495 (2001).
- Faivre, E. J., Daniel, A. R., Hillard, C. J. & Lange, C. A. Progesterone Receptor Rapid Signaling Mediates Serine 345 Phosphorylation and Tethering to Specificity Protein 1 Transcription Factors. *Mol. Endocrinol. Balt. Md***22**, 823–837 (2008).
- Faivre, E., Skildum, A., Pierson-Mullany, L. & Lange, C. A. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids***70**, 418–426 (2008).
- Felix, C. A. *et al.* p53 gene mutations in pediatric brain tumors. *Med. Pediatr. Oncol.***25**, 431–436 (1995).
- Fontaine, T., Lind, C. R. P. & Law, A. J. J. Primary glioblastomas and anaplastic astrocytoma in a glioma family. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.***13**, 497–501 (2006).
- Furnari, F. B. *et al.* treatment Malignant astrocytic glioma : genetics , biology , and paths to treatment. *Genes Dev.***21**, 2683–2710 (2007).

Ganong W. Las gónadas: desarrollo y función del sistema reproductor. *Fisiología médica*, México, Editorial: El Manual Moderno. Pp 387-425 (2006).

Genazzani, A. R. *et al.* Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Hum. Reprod.* **15 Suppl 1**, 14–27 (2000).

Giangrande, P. H. & McDonnell, D. P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog. Horm. Res.* **54**, 291–313; discussion 313–314 (1999).

Giangrande, P. H., A Kimbrel, E., Edwards, D. P. & McDonnell, D. P. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3102–3115 (2000).

González-Agüero, G. *et al.* Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* **32**, 129–135 (2007).

Gonzalez-Aguero, G., Ondarza, R., Gamboa-Dominguez, A., Cerbon, M. A. & Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* **56**, 43–48 (2001).

Gonzalez-Arenas, A., Aguilar-Maldonado, B., Avendano-Vazquez, S. E. & Garcia-Sainz, J. A. Estrogens cross-talk to alpha1b-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* **70**, 154–162 (2006).

González-Arenas A., Peña-Ortiz M.A., Hansberg-Pastor V., Marquina-Sánchez B., Baranda-Avila N., Nava-Castro K., Cabrera-Wrooman A. y Camacho-Arroyo I. PKC α and δ are involved in phosphorylation, activation and degradation of Progesterone Receptor in glioblastoma cells. (en preparación)

González-Arenas, A., Villamar-Cruz, O., Guerra-Araiza, C. & Camacho-Arroyo, I. Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **85**, 25–31 (2003).

González-Morán, M. G., González-Arenas, A., Germán-Castelán, L. & Camacho-Arroyo, I. Changes in the content of sex steroid hormone receptors in the growing and regressing ovaries of *Gallus domesticus* during development. *Gen. Comp. Endocrinol.* **189**, 51–58 (2013).

Gore-Langton, R. E. Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* **57**, 187–198 (1988).

Graham, J. D. & Clarke C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* **18**, 502-19 (1997).

Guerra-Araiza, C. *et al.* Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology***90**, 73–81 (2009).

Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., Chavira, R. & Camacho-Arroyo, I. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.***15**, 984–990 (2003).

Hagan, C. R., Daniel, A. R., Dressing, G. E. & Lange, C. a. Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol. Cell. Endocrinol.***357**, 43–9 (2012).

Hernández-hernández, O. T. & Camacho-arroyo, I. Regulation of Gene Expression by Progesterone in Cancer Cells : Effects on. 635–642 (2013).

Hernandez-Hernandez, O. T., Gonzalez-Garcia, T. K. & Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol***132**, 127–134 (2012).

Huang, H.-D., Lee, T.-Y., Tzeng, S.-W. & Horng, J.-T. KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res.***33**, W226–W229 (2005).

Huse, B., Verca, S. B., Matthey, P. & Rusconi, S. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol. Balt. Md***12**, 1334–42 (1998).

Inestrosa, N. C. *et al.* Import citations into your digital library using the Mendeley Web Importer | Mendeley. *Neurobiol. Aging***122**, 491 (2011).

Inoue, T. Progesterone Production and Actions in the Human Central Nervous System and Neurogenic Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.***87**, 5325–5331 (2002).

JB Minireview-Protein Kinase C Isoforms and Their Specific Function Protein Kinase Shigeru Ca Regulation and Biological Function The implication of PKC in cell growth was first demonstrated stimulated. (2002).

Kajimoto, T., Sawamura, S., Tohyama, Y., Mori, Y. & Newton, A. C. Protein kinase C delta-specific activity reporter reveals agonist-evoked nuclear activity controlled by Src family of kinases. *J. Biol. Chem.***285**, 41896–41910 (2010).

Kastner, P. *et al.* transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.***9**, 1603–1614 (1990).

Khalid, H. *et al.* Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer***80**, 2133–2140 (1997).

Knotts, T. A., Orkiszewski, R. S., Cook, R. G., Edwards, D. P. & Weigel, N. L. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem***276**, 8475–8483 (2001).

Koivunen, J., Aaltonen, V. & Peltonen, J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett.***235**, 1–10 (2006).

Konopatskaya, O. & Poole, A. W. Protein kinase Calpha: disease regulator and therapeutic target. *Trends Pharmacol. Sci.***31**, 8–14 (2010).

Lange, C. A. Events in Breast Cancer Models. **108**, 203–212 (2009).

Lange, C. A. Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol***18**, 269–278 (2004).

Lange, C. A., Shen, T. & Horwitz, K. B. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A***97**, 1032–1037 (2000).

Li, W. Q., Yu, J. C., Shin, D. Y. & Pierce, J. H. Characterization of a Protein-Kinase C-Delta (Pkc-Delta) Atp Binding Mutant. *J. Biol. Chem.***270**, 8311–8318 (1995).

Lim, C. S. *et al.* Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol. Endocrinol. Balt. Md***13**, 366–375 (1999).

Lin, C.-W. *et al.* 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion/migration of glioblastoma cells through activating PKCalpha/ERK/NF-kappaB-dependent MMP-9 expression. *J. Cell. Physiol.* **225**, 472–481 (2010).

Liu, Z., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***98**, 12426–12431 (2001).

- Mackay, H. J. & Twelves, C. J. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat. Rev. Cancer***7**, 554–562 (2007).
- Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Galbiati, M. & Martini, L. Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.***46**, 145–176 (2001).
- Misrahi, M. *et al.* Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta***1216**, 289–292 (1993).
- Moore, M. R. *et al.* A sequence in the 5' flanking region confers progestin responsiveness on the human c-myc gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.***62**, 243–252 (1997).
- Morali, G. *et al.* Neuroprotective effects of progesterone and allopregnanolone on long-term cognitive outcome after global cerebral ischemia. *Restor. Neurol. Neurosci.***29**, 1–15 (2011).
- Murphy, L. J., Sutherland, R. L., Stead, B., Murphy, L. C. & Lazarus, L. Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res***46**, 728–734 (1986).
- Musgrove, E. A., Lee, C. S. & Sutherland, R. L. Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol***11**, 5032–5043 (1991).
- Nakajima, T. Positive and negative regulation of radiation-induced apoptosis by protein kinase C. *J. Radiat. Res.* **49**, 1–8 (2008).
- Newton, A. C. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol***9**, 161–167 (1997).
- Nguyen, J. P., Caron J.P., Gaston A., Louarn F. & Poirier J. Anatomoradiological correlations in astrocytic cerebral tumors. *Neurochirurgie***30**, 11-5 (1984).
- Nilsen, J. & Brinton, R. D. Impact of progestins on estradiol potentiation of the glutamate calcium response. *Neuroreport***13**, 825–830 (2002).
- Okhrimenko, H. *et al.* Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells. *Cancer Res.* **65**, 7301–7309 (2005).
- Owen, G. I., Richer, J. K., Tung, L., Takimoto, G. & Horwitz, K. B. Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J. Biol. Chem.***273**, 10696–10701 (1998).

Pierson-Mullany, L. K. & Lange, C. A. Phosphorylation of Progesterone Receptor Serine 400 Mediates Ligand-Independent Transcriptional Activity in Response to Activation of Cyclin-Dependent Protein Kinase 2. **24**, 10542–10557 (2004).

Proietti, C. *et al.* Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.***25**, 4826–4840 (2005).

Qiu, M. & Lange, C. A. MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.***85**, 147–157 (2003).

Rosenblum, M. K. The 2007 WHO Classification of Nervous System Tumors: newly recognized members of the mixed glioneuronal group. *Brain Pathol. Zurich Switz.***17**, 308–313 (2007).

Rowan, B. G., Weigel, N. L. & O'Malley, B. W. Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem***275**, 4475–4483 (2000).

Sarkar, C., Jain, A. & Suri, V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J. Cancer***46**, 108–119 (2009).

Sarkar, S. & Yong, V. W. Inflammatory cytokine modulation of matrix metalloproteinase expression and invasiveness of glioma cells in a 3-dimensional collagen matrix. *J Neurooncol***91**, 157–164 (2009).

Sarkar, S. & Yong V.W. Reduction of protein kinase C delta attenuates tenascin-C stimulated glioma invasion in three-dimensional matrix. *Carcinogenesis***31**, 311-7 (2010).

Sartorius, C. A. *et al.* A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol. Endocrinol. Balt. Md***8**, 1347–1360 (1994).

Scarpin, K. M., Graham, J. D., Mote, P. a & Clarke, C. L. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl. Recept. Signal.***7**, e009 (2009).

Schumacher, M., Coirini, H., Robert, F., Guennoun, R. & El-Etr, M. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav. Brain Res.***105**, 37–52 (1999).

Schwartzbaum, J.A., Fisher J.L., Aldape, K.D., & Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pr. Neurol.* **2**, 494-503; quiz 1 p following 516 (2006).

Sharif, T. R. & Sharif, M. Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int J Oncol***15**, 237–243 (1999).

Shen, T., Horwitz, K. B. & Lange, C. A. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol***21**, 6122–6131 (2001).

Steinberg, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.***88**, 1341–1378 (2008).

Sutherland, R. L., Prall, O. W., Watts, C. K. & Musgrove, E. A. Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia***3**, 63–72 (1998).

Takimoto, G. S. *et al.* Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem***271**, 13308–13316 (1996).

Tata, J. R. Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 702-10 (2002).

Tomiya, T., Kang, J. H., Toita, R., Niidome, T. & Katayama, Y. Protein kinase Calpha-responsive polymeric carrier: its application for gene delivery into human cancers. *Cancer Sci***100**, 1532–1536 (2009).

Tsai, M. J. & O'Malley B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.***63**, 451-86 (1994).

Tseng, L., Tang, M., Wang, Z. & Mazella, J. Progesterone receptor (hPR) upregulates the fibronectin promoter activity in human decidual fibroblasts. *DNA Cell Biol.***22**, 633–640 (2003).

Vienonen, A., Syvala, H., Miettinen, S., Tuohimaa, P. & Ylikomi, T. Expression of progesterone receptor isoforms A and B is differentially regulated by estrogen in different breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol***80**, 307–313 (2002).

Villamar-Cruz, O., Manjarrez-Marmolejo, J., Alvarado, R. & Camacho-Arroyo, I. Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their

cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res Bull***69**, 276–281 (2006).

Wang, S. *et al.* Progesterone receptor A stability is mediated by GSK-3 β kinase in the Brca1-deficient mammary gland. *J. Biol. Chem.* (2013).

Weigel, N. L. *et al.* Phosphorylation and progesterone receptor function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.***53**, 509–514 (1995).

Yang, S.-H., Jaffray, E., Senthinathan, B., Hay, R. T. & Sharrocks, A. D. SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways. *Cell cycle Georg. Tex***2**, 528–530 (2003).

Zhang, Y. *et al.* Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol***11**, 823–832 (1997).

Zhang, Y., Beck, C. A., Poletti, A., Edwards, D. P. & Weigel, N. L. Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol***9**, 1029–1040 (1995).

Zhang, Y., Beck, C. A., Poletti, A., Edwards, D. P. & Weigel, N. L. Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem***269**, 31034–31040 (1994).

Zwain, I. H. & Yen, S. S. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology***140**, 3843–3852 (1999).