



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL  
RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES Y LA  
SUBUNIDAD CATALÍTICA DE PKA EN LA  
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN pro-  
TRH**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A  
P R E S E N T A:**

**DIANA ELISA VELÁZQUEZ VÁZQUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO**

**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018**





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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco mucho a mis padres Mónica Vázquez y Alejandro Velázquez, y a mis hermanos Alejandro, Karina y Andrea, por todo el apoyo que siempre me brindaron, por el cariño con el que me guiaron, por su paciencia durante todos estos años y por el compromiso que tuvieron con mi formación académica para procurarme un mejor futuro. Son mi fuerza y mi refugio.

Al Dr. Israim Sotelo Rivera, le agradezco su asesoría, sus consejos y su guía en la elaboración de este proyecto; al M. C. Adrián Pérez Maldonado por sus correcciones, sus observaciones, su apoyo y los buenos ratos en el laboratorio también le doy gracias. Gracias a la Dra. Antonieta Cote Vélez por sus ánimos, su grata compañía, su amistad y sus consejos durante el desarrollo experimental.

Les agradezco a la Quim. Fidelia Romero Arteaga su invaluable ayuda en la obtención de los plásmidos y por sus atinadas observaciones, a la Dra. Mariana Gutiérrez Mariscal por su asistencia y apoyo en la parte experimental, al Q.F.B. Miguel Ángel Cisneros por su apoyo en la parte técnica y manejo de equipos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y del IBT, a mis compañeros tallerines y a mis roomies, que coincidieron conmigo en esta vida y en Cuernavaca, les agradezco su compañía, su amistad y los momentos de recreación que me permitieron relajarme y seguir con el proyecto; sobre todo agradezco sus porras, las cuales nunca me permitieron rendirme. A Luis Mejía, Diana Pérez y al biofilm del que fui parte en la Facultad de Ciencias. Gracias por su sincera amistad y por estar desde el principio.

Finalmente doy agracias a la Dra. Patricia Joseph su confianza, sus enseñanzas y sobre todo la paciencia y el compromiso que tuvo al guiarme en la finalización de mi tesis. Agradezco también a los sinodales que revisaron y corrigieron la presente tesis (Dres. Israim Sotelo Rivera, Lorraine James Hoy, Aliesha Gonzalez Arenas y M. C. Gabriela Piña Medina).

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Fue financiada con la beca de ayudante de investigador (SNI) y el proyecto DGAPA IN204316.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. Resumen.....  | 1  |
| 2. Introducción.....   | 2  |
| 2.1. El estrés y el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA).....   | 2  |
| 2.2. Receptor de Glucocorticoides (GR).....  | 4  |
| 2.3. Señalización mediada por GR.....  | 9  |
| 2.4. La homeostasis de la energía y el eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT).....                     | 12 |
| 2.5. TRH.....  | 14 |
| 2.5.1. Biosíntesis de TRH.....   | 14 |
| 2.5.2. Promotor proximal de TRH y su regulación transcripcional.....                                     | 16 |
| 3. Antecedentes.....   | 18 |
| 4. Justificación.....  | 20 |
| 5. Hipótesis.....  | 20 |
| 6. Objetivo general.....   | 20 |
| 7. Objetivos particulares.....   | 20 |
| 8. Materiales y métodos.....   | 20 |
| 8.1. Cultivo celular.....  | 20 |
| 8.2. Transfección transitoria.....   | 21 |
| 8.3. Estimulación y cosecha. Obtención de proteínas citosolicas y nucleares.....                         | 23 |
| 8.4. Cuantificación de Proteínas.....  | 24 |
| 8.5. Western Blot.....   | 24 |
| 8.6. Stripping.....  | 25 |
| 9. Resultados.....   | 25 |
| 9.1. Estandarización de la transfección.....   | 25 |
| 9.2. SH-SY5Y expresa bajas cantidades de GR endógeno.....  | 26 |
| 9.3. Expresión de mutantes de GR bajo estimulación de Dexametasona y de<br>Dexametasona+Forskolina ..... | 26 |
| 10. Discusión.....   | 34 |
| 11. Conclusión.....  | 37 |
| 12. Anexos.....  | 38 |
| 12.1. Abreviaturas.....  | 38 |
| 12.2. Composición de buffers utilizados.....   | 41 |
| 13. Referencias bibliográficas.....  | 43 |

# 1. RESUMEN

El estrés es un estímulo que moviliza los sistemas energéticos para responder a un desafío que altera la homeostasis. El eje HPA responde al estrés y su producto final son los GC, liberados de la corteza adrenal. Los GC ejercen su efecto a través de su receptor nuclear GR que a su vez es un factor de transcripción dependiente de ligando. Cuando GR se activa, migra al núcleo donde se une al sitio GRE en el promotor de sus genes blancos. El promotor proximal del gen pro-TRH tiene un sitio GRE compuesto y un sitio CRE al que se une CREB fosforilada por la PKAc. La incubación de dexametasona (Dex; análogo sintético de glucocorticoides) en conjunto con los análogos de AMPc, inhibe la transcripción del gen pro-TRH. La interferencia entre la vía de los glucocorticoides y del AMPc se debe a la interacción GR:PKAc que impide que GR activado o CREB se unan a sus elementos de respuesta en el promotor de pro-TRH. Con el objetivo de comparar la eficiencia de transfección de las distintas mutantes de GR, su localización subcelular al estimularlas con Dex o con Dex+Fsk, y si respaldan lo observado en su actividad transcripcional evaluada en un trabajo previo, se transfectó la línea celular SH-SY5Y con GR mutados en el dominio de unión al DNA (DBD) L501P o el dominio amino-terminal (N-terminal) S224A y T171A, y se estimularon con Dex [ $1 \times 10^{-7}$  M] y con Dex [ $1 \times 10^{-7}$  M]+Fsk [ $1 \times 10^{-5}$  M]. Se separaron los extractos proteicos citosólicos de los nucleares para hacer WB. Los resultados presentados en esta tesis son preliminares y sugieren que los residuos T171 y L501, con base en los resultados de su actividad transcripcional (Tesis de maestría Sotelo-Rivera, 2012), son importantes para la interacción con PKAc ya que se libera la interferencia observada bajo la incubación con Dex+Fsk; también podrían ser importantes para la localización celular de GR. La fosforilación de S224 es importante para la localización celular de GR y para su vida media, pero podría no ser importante para la interacción de GR con PKAc.

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. *EL ESTRÉS Y EL EJE HIPOTÁLAMO- PITUITARIA-ADRENAL (HPA).*

El estrés es un estímulo que moviliza los sistemas energéticos para responder a un desafío que altera la homeostasis (Myers *et al.*, 2014), activa múltiples vías en el sistema nervioso central (SNC), dependiendo del estímulo (físico o psicológico), que convergen en el hipotálamo, estimulando la respuesta del sistema nervioso autónomo (SNA) simpático y al sistema neuroendocrino (Kvetnansky *et al.*, 2009). Estresores fisiológicos como el frío, el dolor y la enfermedad se consideran estresores físicos e involucran circuitos neuronales que usualmente son codificados al nivel del tallo cerebral, mientras que los estresores psicológicos son motivados por experiencias previas e involucran áreas del sistema límbico como la amígdala, el hipocampo y la corteza frontal. Todos estos estímulos inciden, de manera directa o indirecta en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo (Herman *et al.*, 2012) en donde neuronas hipofisiotrópicas CRHérgicas dan inicio a la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA).

Además de la activación del eje HPA, la respuesta al estrés incluye al SNA simpato-adrenal, responsable de la liberación de adrenalina (Adr) y noradrenalina (NA). Según su terminación y rol funcional, el sistema simpato-adrenal se puede dividir en dos vías: 1) las células cromafines en la médula adrenal constituyen la porción periférica del sistema simpato-adrenomedular, que es principalmente responsable de la liberación de Adr circulante y aproximadamente del 30% de NA en el plasma; 2) neuronas ganglionares simpáticas en el paravertebral (ganglios superiores cervicales estrellados) y ganglios simpáticos prevertebrales que inervan órganos y tejidos periféricos cuyas terminales sintetizan y liberan NA. El sistema simpato-adrenomedular (liberación de ADR) responde a estresores como la inmovilización, la hipoglucemia, la hemorragia hipotensiva, la angustia emocional, el shock y el miedo, mientras que el sistema simpato-neural (liberación de NA) desempeña papeles clave en respuesta a la exposición al frío, el ejercicio, la inmovilización,

escape activo, hemorragia no hipotensora, dolor, glucoprivación, evitación, ingesta de sal alterada e inmersión en agua (Kvetnansky et al., 2009) (Figura 1); su acción es específica sobre los órganos involucrados dependiendo del tipo de estrés (i.e. frío-tejido adiposo pardo). Los sistemas HPA y simpato-adrenal son los principales sistemas efectores que sirven para mantener la homeostasis durante una exposición a varios estresores.

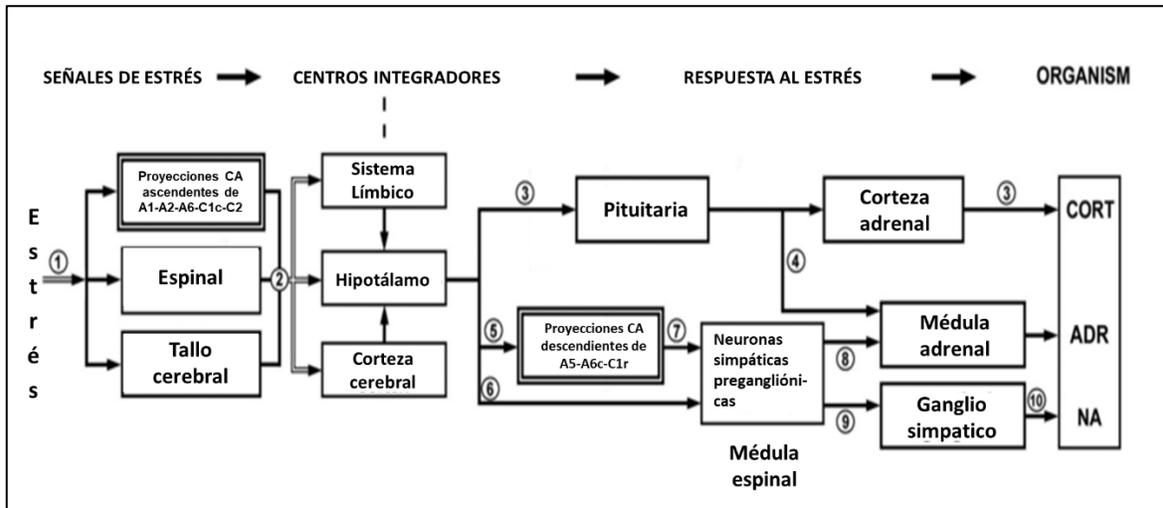


Figura 1. Organización central de respuesta al estrés. CA: catecolamina; CORT: corticosterona; ADR: adrenalina; NA: noradrenalina. Modificada de Kvetnansky et al. (2009).

Cuando el eje HPA se activa, las neuronas hipofisiotrópicas CRHérgicas del PVN liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) a la eminencia media donde se encuentra un sistema de vasos capilares (sistema porta); la CRH viaja por el sistema porta hasta la pituitaria anterior en donde estimula la síntesis y la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) a la periferia (circulación sistémica). El órgano blanco de la ACTH es la corteza de la glándula adrenal donde estimula la secreción de glucocorticoides (GC) (cortisol en humanos y corticosterona en roedores). Los GC ejercen una retroalimentación negativa sobre el eje HPA mediante la represión transcripcional de Crh en el PVN y pro-opiomelanocortina (Pomc) en la hipófisis anterior (precursor de ACTH) (Myers et al., 2014).

Los GC participan en la regulación de múltiples eventos fisiológicos como por ejemplo durante el desarrollo, la reproducción, la homeostasis metabólica, la cognición, la proliferación celular y la respuesta inmune e inflamatoria (Beato & Klug, 2000; Biddie *et al.*, 2012; Schmid *et al.*, 1995; Wilder *et al.*, 1993).

## 2.2 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR).

La actividad biológica de los GC está mediada por dos receptores, pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares hormonales que los reconocen con distinta afinidad: el receptor de mineralocorticoides (MR) y el receptor de glucocorticoides (GR). MR tiene una alta afinidad por los GC, por lo que a niveles basales se encuentra activado en la mayoría de los tejidos; el GR, al tener una afinidad 10 veces más baja, solo se compromete durante una respuesta al estrés y en el zenit del ciclo circadiano, cuando los niveles de GC en plasma son altos (Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez, 2015; Sacta *et al.*, 2016). En este trabajo nos concentraremos en el efecto de los GC a través del receptor nuclear GR.

GR es un factor de transcripción inducible por ligando (Vandevyver *et al.*, 2012; Whitfield *et al.*, 1999), reside predominantemente en el citosol de la célula, en asociación con un complejo de proteínas chaperonas compuesto por proteínas de choque térmico (Hsp) Hsp90, Hsp70, Hsp40, inmunofilinas, proteínas de unión a FK506 (FKBPs), ciclofilina 40 (Cyp-40) y p23. Este complejo de chaperonas participa en el plegamiento y maduración de GR, modifica su conformación permitiéndole pasar de un estado de baja a alta afinidad por el ligando (Vandevyver *et al.*, 2012).

Existen diferentes isoformas de GR resultantes del “splicing” alternativo, las más estudiadas por su abundancia son GR $\alpha$  y GR $\beta$  (Lu & Cidlowski, 2006; Revollo & Cidlowski, 2009). GR $\alpha$  se une a GC mientras que GR $\beta$  no y sólo interactúa con el DNA funcionando como un inhibidor dominante negativo de GR $\alpha$  (Lewis-Tuffin & Cidlowski, 2006; Oakley *et al.*, 1999).

Como la mayoría de los receptores nucleares hormonales, GR está organizado en tres dominios funcionales principales. En el extremo amino (N)-terminal, que comprende los aminoácidos del 1 al 417, se encuentra el dominio de función de activación 1 (AF-1), requerido para el reclutamiento de co-activadores y de su capacidad de asociación con diversos factores de transcripción (FT). El área central de GR (aminoácidos 418 a 487) contiene dos dedos de zinc que conforman el dominio de unión a DNA (DBD) y un dominio de localización nuclear (NLS1) que contiene una estructura bipartita situada cerca del límite del DBD (Rogatsky *et al.*, 1998) el cual se encarga del importe nuclear rápido de GR (Savory *et al.*, 1999). Los dedos de zinc son cruciales para la unión de GR a la secuencia de DNA, la cual se denomina elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), presente en el promotor del gen blanco (Beck *et al.*, 2009). Junto a este dominio se encuentra una secuencia corta (aminoácidos 488 a 520) conocida como región bisagra (HR) que también participa en la translocación nuclear. Finalmente, en el extremo carboxilo (C)-terminal de GR (aminoácidos 521 a 777) se encuentra el dominio de unión al ligando (LDB), responsable de la unión de GR con los GC. Dentro de LBD también se encuentran otras regiones como: el dominio de función de activación 2 (AF-2) que queda expuesto después del cambio conformacional inducido por la unión al ligando (Kassel & Herrlich, 2007), una segunda secuencia de translocación nuclear (NLS2) que en comparación con NLS1 funciona más lentamente y es incapaz de brindar una completa localización nuclear (Savory *et al.*, 1999), y secuencias importantes para la interacción de GR con las proteínas Hsp (Figura 2). La función de ATPasa de Hsp90 y Hsp70 es importante para hacer que el dominio LBD sea accesible al ligando (Morishima *et al.*, 2000).

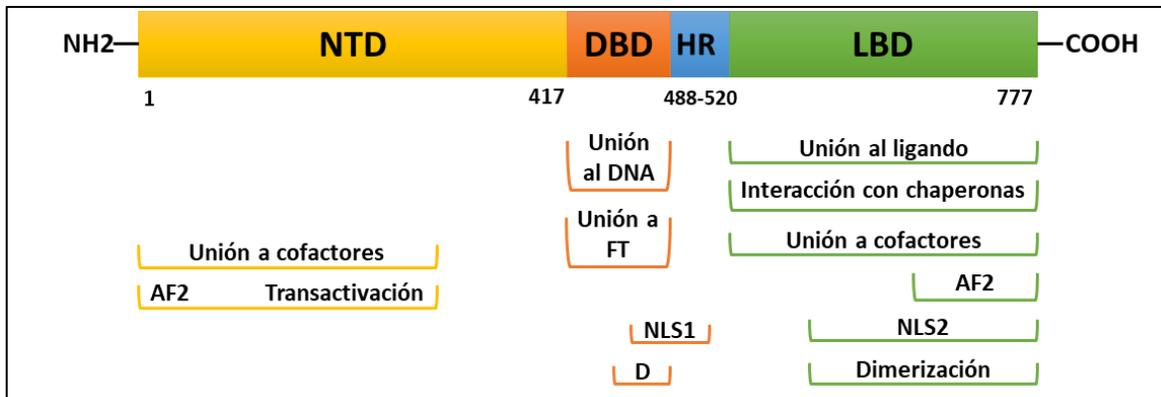


Figura 2. Estructura y dominios funcionales de GR. NTD: Dominio N-terminal. DBD: Dominio de unión a DNA. HR: Región bisagra. LBD: Dominio de unión a ligando. AF1 y AF2: Función de activación 1 y 2. NLS 1 y 2: Secuencia de translocación nuclear 1 y 2

Según el modelo clásico, una vez que los GC llegan al receptor en el citosol, se unen al LBD en la región C-terminal y GR es sometido a un cambio conformacional que lo hace liberarse del complejo multiprotéico y exponer su secuencia de translocación nuclear; el complejo GR-GC se mueve rápida y libremente a través del citoesqueleto hasta introducirse en el núcleo de la célula donde activa o reprime la transcripción de genes inducibles por GC. Para que haya una completa activación transcripcional de GR, el complejo GR-GC debe unirse al promotor del gen, para esto requiere que los dedos de zinc del DBD del receptor se unan al surco mayor del DNA, en el palíndromo imperfecto del GRE en el promotor (5'GGTACAnnnTGTTCT 3').

GR, así como el resto de los miembros de la superfamilia de receptores esteroideos, es sometido a modificaciones post-traduccionales tales como la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación. Los efectos de la fosforilación de GR varían dependiendo del sitio de fosforilación, el contexto celular y las secuencias GRE del promotor, afectando su asociación con co-activadores, su translocación nuclear y su estabilidad (Beck et al., 2011, 2009; Biddie y Hager, 2009; Blind et al., 2012; Galliher-Beckley and Cidlowski, 2009; Kino et al., 2007; Krstic et al., 1997; Popovic et al., 2010; Schena et al., 1989; Ratman et al., 2013; Wang et al., 2002). Análisis de la secuencia de GR de rata (rGR), ratón (mGR) y humano (hGR) indican la

conservación de los sitios de fosforilación y de sus secuencias adyacentes (Almolöf et al.,1995; Bodwell et al., 1991; Galliher-Beckley & Cidlowski, 2009; Ismaili & Garabedian, 2004; Rogatsky et al., 1998b). La Tabla 1 muestra los sitios de fosforilación importantes en la actividad transcripcional de GR de ratón, rata y humano. El rGR tiene 4 principales sitios de fosforilación localizados en su dominio N-terminal, las serinas 224, 232, 246, y la treonina 171 (Krstic et al.,1997).

La treonina 171 (T171) es fosforilada por dos cinasas: la cinasa dependiente de mitógeno (MAPK) (Krstic et al.,1997) y la cinasa glicógeno sintasa 3 (GSK3) (Rogatsky et al., 1998b) que fosforila a éste residuo de una manera mucho más eficiente; esta fosforilación se encuentra sujeta a cambios en el ciclo celular (Hu-Jm et al.,1994). La serina (S) 246 (S246) es fosforilada solo por la C-Jun N-terminal cinasa (JNK) (Rogatsky et al.,1998a). Tanto T171 como S246 en el rGR se encuentran fosforiladas de manera constitutiva (Krstic et al., 1997; Pocuca et al., 1998) y tienen un efecto negativo en la actividad transcripcional del receptor (Krstic et al.,1997; Rogatsky 1998a). La fosforilación constitutiva de la S246 del rGR es importante porque podría estar comprometiendo la actividad transcripcional del receptor, previniendo la fosforilación de la S224 y S232 (Popovic et al., 2010). La S224 y S232 del rGR son fosforiladas por cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y la fosforilación solo ocurre en presencia de su ligando (Krstic et al.,1997; Pocuca et al., 1998). La fosforilación de S224 y S232 es co-dependiente y requerida para una completa activación transcripcional del rGR (Krstic et al.,1997). De acuerdo a Wang et al., (2002), la fosforilación en la S211 de hGR (S232 en rGR) podría alterar la conformación del receptor y modular interacciones con cofactores que faciliten la transactivación del receptor. Estos datos en conjunto permiten deducir que existe una fuerte relación entre la fosforilación de S211 (hGR) y la transactivación del receptor.

Tabla 1. Importantes residuos fosforilados del GR de rata (rGR) con sus posiciones equivalentes en el GR de humano (hGR) y ratón (mGR).

\*Hay una alanina en el hGR en la posición equivalente a T171 en rGR, pero no se ve afectada por GSK-3.

| Ratón | Rata | Humano | Cinasa                        | Efecto de la fosforilación en la actividad transcripcional  | Efecto de la mutación sobre la actividad transcripcional   | Referencias                 |
|-------|------|--------|-------------------------------|---|--|-----------------------------|
| T159  | T171 | *A150  | GSK-3<br>MAPK                 | Inhibe la transcripción   | Aumento o disminución en la transcripción. Depende del promotor.   | 44, 50                      |
| S212  | S224 | S203   | CDK-5<br>JNK<br>CDK-2         | Fosforilación dependiente de ligando. Favorece la fosforilación de S211 (hGR)/S232 (rGR)/S220 (mGR) por el complejo ciclina A/CDK2. Impide la fosforilación de S234 (mGR)/S246 (rGR)/S226 (hGR).  | Se inhibe el 50% de la transcripción de algunos genes. La mutación no impide la fosforilación de S211 (hGR)/S232 (rGR)/S220 (mGR). | 5, 30, 65, 66               |
| S220  | S232 | S211   | CDK-2<br>CDK-5<br>P38<br>MAPK | Promueve la translocación nuclear de GR y su actividad transcripcional. Promueve un cambio conformacional que facilita su interacción con co-reguladores.   | Disminuye la actividad transcripcional y los niveles de proteína del receptor.   | 5, 7, 30, 65, 66,           |
| S234  | S246 | S226   | JKN                           | Influye negativamente en la fosforilación de S212 (mGR)/S224 (rGR)/S203 (hGR), lo que a su vez impide la fosforilación de S211 (hGR)/S232 (rGR)/S220 (mGR) promoviendo el transporte nuclear de GR. El transporte nuclear de GR tiene un efecto negativo en su actividad transcripcional. Incrementa la sumoilación del receptor. Controla los niveles de proteína. | Aumenta la actividad transcripcional. Disminuye la sumoilación de GR.  | 1, 5, 7, 22, 23, 44, 50, 53 |

CDKs y MAPKs fosforilan al GR y modulan su estabilidad, su localización nuclear y su actividad transcripcional. Sin embargo, debido a que estas cinasas pueden estar reguladas por otros factores, además de tener una expresión tejido-específica, la modulación de la función de GR adquiere mayores niveles de complejidad. Los miembros de la familia MAPKs reciben señales de estímulos extracelulares que controlan la respuesta celular al ambiente, tales como el estrés y mitógenos (Davis, 2000; Karin & Gallagher, 2005; Yang et al., 2003). La fosforilación del receptor dada por varios complejos ciclina/CDK ocurre durante el ciclo celular.

Experimentos realizados por Schena et al., (1989), utilizando mutaciones puntuales del rGR que afectaban su activación transcripcional, revelaron que la reducción se debía a una región de 66 aminoácidos en los dedos de zinc; específicamente, las mutaciones que afectaron la unión del receptor al DNA fueron aquéllas realizadas en las cisteínas distribuidas a lo largo de los dedos de zinc ya que éstas coordinan los iones de zinc. Otras mutaciones importantes fueron en los 5 aminoácidos río abajo de cada dedo de zinc, como la de la lisina 501 (L501) del rGR que utilizaremos en este trabajo.

### 2.3 SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR GR.

Una vez que el GR está en el núcleo, dimeriza con otro GR y el homodímero se une a su sitio GRE, llevado a cabo la activación o represión de la transcripción (Figura 3-A). En el modelo clásico, GR recluta componentes clave de la maquinaria basal de transcripción (co-activadores o co-represores) a la caja TATA del promotor; algunos de estos componentes pueden ser remodeladores de la cromatina (Wallberg et al., 1999).

Una forma exclusiva de transrepresión es debido a elementos de respuesta a glucocorticoides negativos (nGRE) (Figura 3-B)(Sakai et al., 1988); la interacción GR-nGRE lleva a cabo la represión de genes evitando la dimerización del GR, por lo que su unión al DNA se da como monómero y en una orientación única. Existen nGREs en promotores de varios genes, por ejemplo el de POMC (Dostert & Heinzl, 2004).

Es posible también que un GRE se encuentre sobrelapado a un elemento de respuesta de otro FT, de manera que GR y el FT compiten para unirse al DNA resultando en una respuesta transcripcional negativa (Figura 3-D). Un ejemplo claro de esto se observa en el promotor de osteocalcina, cuya caja TATA se sobrelapa con el GRE (Ratman et al., 2013; Strömstedt et al., 1991).

GR puede unirse a un promotor conteniendo sólo a un medio sitio de la secuencia consenso GRE; el monómero del GR se estabiliza al asociarse con un factor de transcripción cuyo elemento de respuesta se encuentra cerca (c-Jun, por ejemplo). A este sitio se le conoce como GRE compuesto (cGRE) (Figura 3-C). El heterodímero de GR puede tener una actividad transcripcional positiva como en el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) en donde GR y el transportador de cationes orgánicos 1 (Oct-1) se unen cooperativamente al DNA para activar la transcripción (Kassel & Herrlich, 2007; Miksicsek & Borgmeyer, 1987); o puede ser negativa, como sucede en el gen de la glutatión S-transferasa (GST) A2, en donde GR se une a su cGRE y posteriormente recluta al co-represor transcripcional llamado mediador del silenciamiento de receptores del ácido retinoico y de hormona tiroidea (SMRT) (Ki, et al., 2005).

GR también puede activar o reprimir la transcripción de promotores que carecen de GREs mediante interacciones proteína-proteína con otros FT que están unidos al DNA (Figura 3-E). Este mecanismo se denomina “de anclaje” (tethering). Un ejemplo de este mecanismo en todo el genoma sucede entre GR y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), cuando STAT3 se encuentra unido al DNA, el anclaje de GR reprime la transcripción (Langlais et al., 2012); por otro lado o de manera inversa, cuando el factor de transcripción del promotor de ovoalbúmina de pollo tipo II (COUP-TFII) se encuentra unido a su elemento de respuesta, el anclaje de GR potencia la activación del promotor (De Martino et al., 2004), lo mismo sucede cuando GR se ancla a STAT5 unido a su elemento de respuesta (Stoecklin et al., 1997). En algunos casos el anclaje puede ser asistido por un mediador (Figura 3-F), como sucede en la represión de GR en promotores

regulados por el factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) y la proteína activadora 1 (AP-1). Una isoforma nuclear de Trip6 (nTrip6, una proteína de adhesión focal que contiene un dominio LIM) interactúa directamente NF- $\kappa\beta$  o AP-1 brindando una plataforma esencial para el reclutamiento estable de GR (Diefenbacher et al., 2010; Kassel et al., 2004).

Otro mecanismo conocido es el “secuestro” (squelching), en el cual GR interactúa con otro FT evitando que éste se una a su elemento de respuesta en el DNA (De Bosscher et al., 2003) (Figura 3-G).

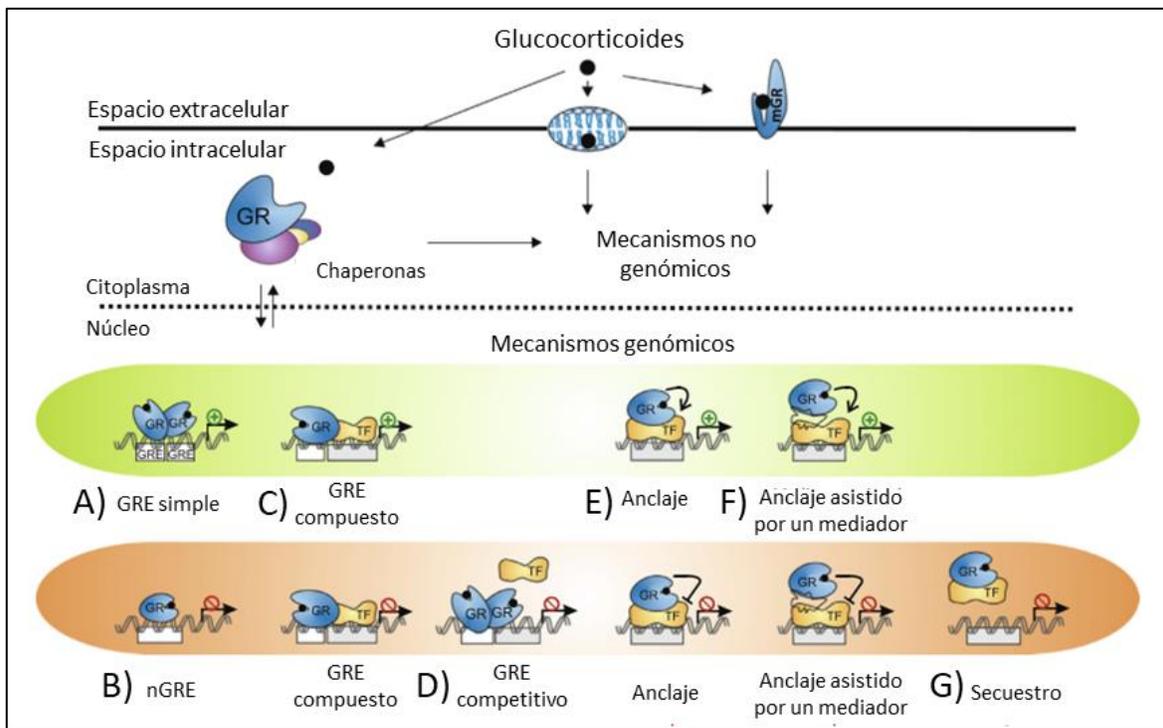


Figura 3. Mecanismos de señalización mediados por GR. A) Un homodímero GR-GR se une al elemento de respuesta a GC (GRE) en el promotor de genes inducibles por GC para activar su transcripción. B) Mecanismos de represión de genes que responden a GC mediante la interacción de GR con un GRE negativo (nGRE). C) Activación o represión de genes que cuentan con medio sitio GRE ( $1/2$ GRE) en su promotor flanqueado por secuencias de unión para otros FT lo que forma un GRE compuesto (cGRE). GR se une al cGRE formando un heterodímero con el FT en cuestión. D) Represión de genes en cuyo promotor tienen un GRE superpuesto con sitios de unión a otros FT. GR como homodímero y un FT que activa la transcripción compiten por dicho sitio. E) Mecanismo de activación o represión de genes que no cuentan con un sitio GRE en su promotor, por lo que GR ejerce su efecto mediante su interacción con otro FT que sí se puede unir al DNA. F) De manera similar al mecanismo anterior, al no contar GR con su sitio de unión al DNA en el promotor de sus genes blanco, GR ejerce su efecto represor o activador mediante su interacción con un intermediario que a su vez interactúa con otro FT, que sí se puede unir al DNA. G) Mecanismo de represión en el

que GR evita la unión de un FT a su sitio de unión en el promotor del gen en cuestión. Modificada de Sacta et al. (2016).

## 2.4 LA HOMEOSTASIS DE LA ENERGÍA Y EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-TIROIDES (HPT).

La homeostasis energética o el balance energético es un proceso en donde el consumo de energía está en equilibrio con el gasto energético dado por el metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis. Este proceso es necesario para asegurar una adecuada distribución de sustratos a las vías metabólicas, lo que le permite al individuo confrontar sus necesidades energéticas durante el día, a cambios en el clima estacional, crecimiento, enfermedades, embarazo, lactancia, ejercicio, etc. El consumo de energía está determinado por la ingesta de alimentos, así como por la cantidad de energía disponible de fuentes internas y externas (Schwartz & Zeltser, 2013). El metabolismo de lípidos y carbohidratos se lleva a cabo por la acción de las hormonas tiroideas (HT), GC y las catecolaminas (NA o ADR). El hipotálamo es reconocido como el sitio de la regulación homeostática ya que integra la información neuronal y las señales hormonales que informan sobre el estatus de energía al organismo y es donde se regulan los ejes neuroendócrinos y autónomos.

En situaciones de demanda de energía se activa el eje Hipotálamo–Pituitaria–Tiroides (HPT). En el hipotálamo las neuronas hipofisiotróficas del PVN sintetizan y liberan a la hormona liberadora de tirotropina (TRH) (Figura 4-A), la cual llega a la eminencia media (Figura 4-B) y luego a la pituitaria anterior donde se estimula la síntesis liberación de tirotropina (TSH) (Figura 4-C). La TSH liberada a la circulación periférica actúa sobre la glándula tiroides y estimula la síntesis y liberación de las HT, 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T4) y 3,5,3'-triiodotironina (T3) (Figura 4-D). T4 es convertida a T3 por la actividad de las enzimas desiodasas 1 y 2, localizadas dentro de la mayoría de los tejidos blanco, incluyendo el sistema nervioso central (Fekete y Lechan 2014). Las HT tienen múltiples blancos responsables de la distribución del gasto de energía, por ejemplo, el tejido adiposo pardo y el hígado (Figura 4-E). La

hormona T3 es la forma biológicamente activa a nivel transcripcional, mediante los receptores a HT ( $TR\alpha$  y  $TR\beta$ ) que actúan como factores transcripcionales que regulan a múltiples genes.

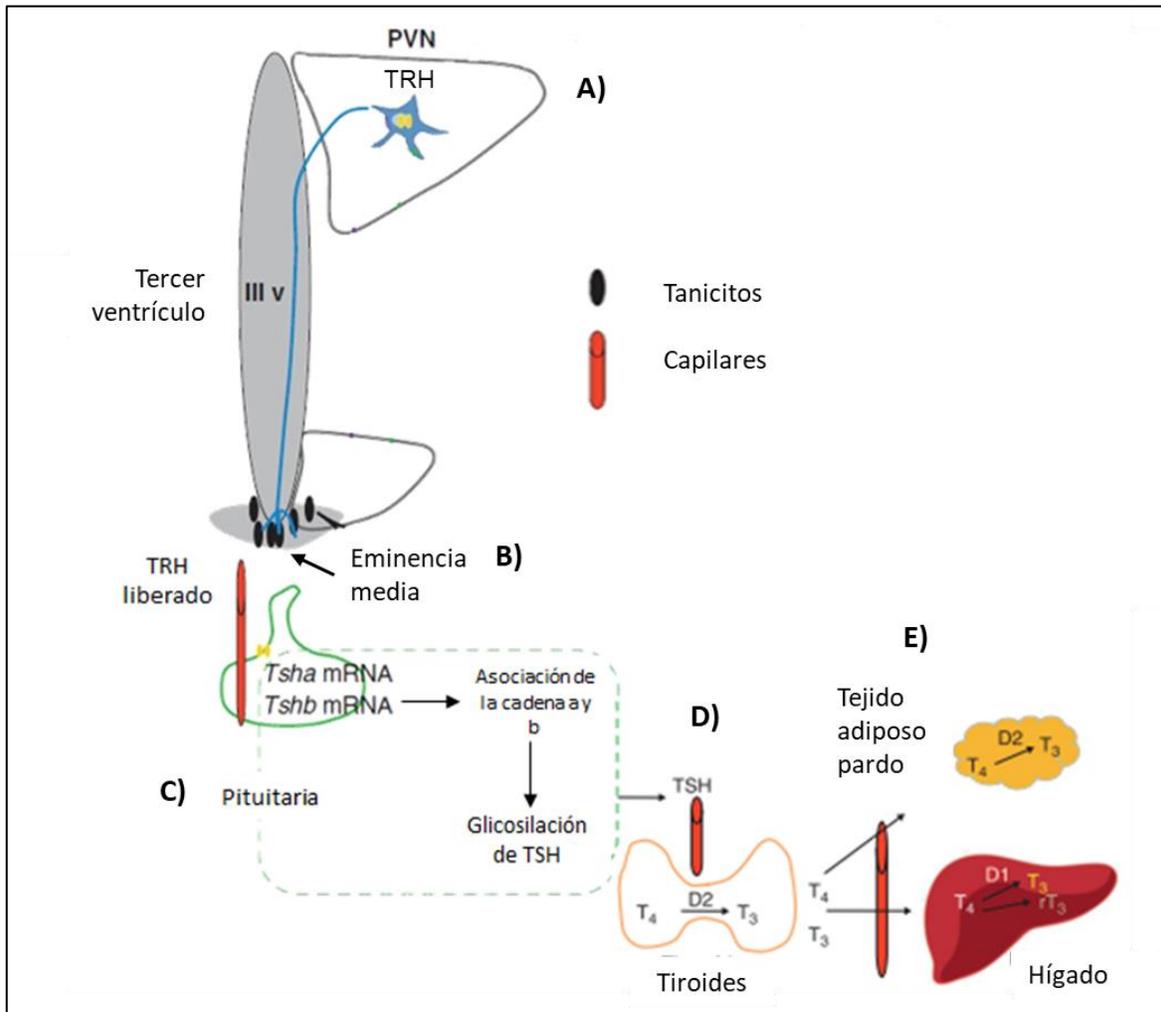


Figura 4. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT). A) En el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), neuronas TRHrgicas sintetizan a la hormona liberadora de corticotropina (TRH). B) TRH es liberada en la eminencia media donde puede ser regulada por los tanicitos. C) A través de un sistema de capilares la TRH estimula la síntesis y liberación de tirotropina (TSH). D) La TSH llega a la tiroides en donde estimula la síntesis y liberación de HT ( $T_4$  y  $T_3$ ).  $T_4$  es convertida a  $T_3$  por la actividad de las enzimas desiodasas 1 y 2, localizadas dentro de la mayoría de los tejidos blanco. E) El hígado y el tejido adiposo pardo son dos blancos de las HT. Modificado de Joseph-Bravo et al (2015b).

Las HT ejercen un efecto de retroalimentación negativa a través de la isoforma 2 del receptor  $\beta$  ( $TR\beta_2$ ) en la pituitaria e hipotálamo inhibiendo la transcripción de TSH y TRH, respectivamente. El eje HPT se inhibe también en condiciones de balance

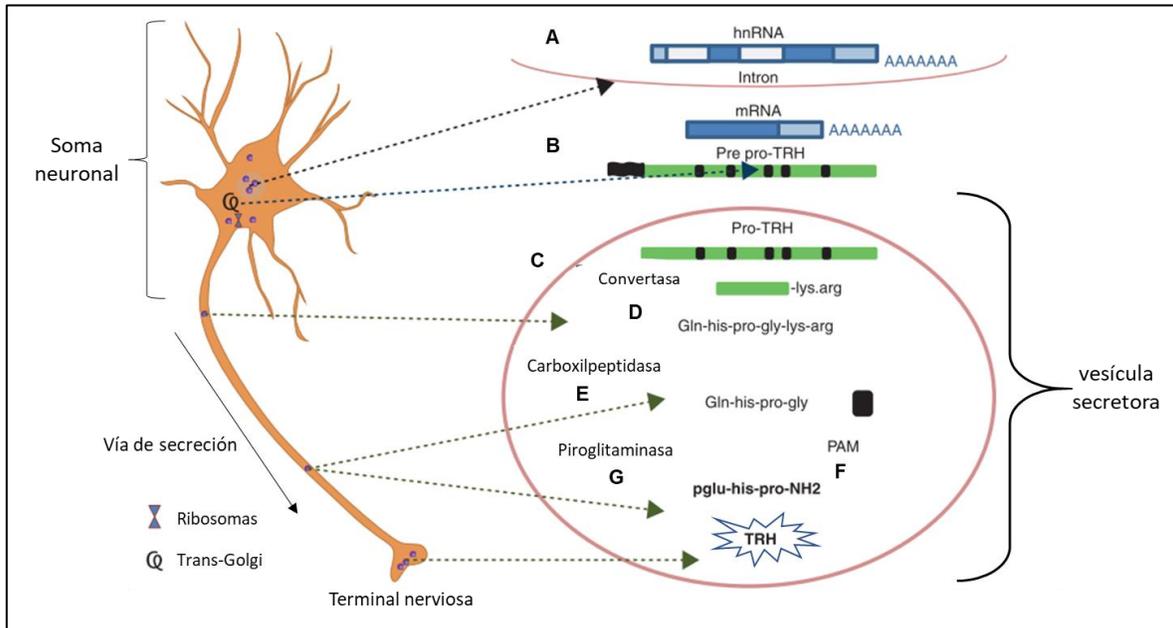
de energía negativo como el ayuno, la restricción de alimento o ante situaciones patológicas incluyendo infecciones o enfermedades críticas, disminuyendo los niveles en suero de TH, así como de la expresión de *Trh* en neuronas hipofisiotróficas. (Fekete y Lechan 2014).

## 2.5 TRH.

### 2.5.1 BIOSÍNTESIS DE TRH

TRH es sintetizada a partir de un precursor inactivo (pro-TRH) a través de una serie de modificaciones post-traduccionales mientras es transportado a través de una vía de secreción. Antes de pro-TRH, se sintetiza primero el transcrito primario prepro-TRH (hnRNA) en el núcleo del soma neuronal, que consta de 225 aminoácidos (Fig. 5-A). Después de su splicing, el RNA maduro es transportado al citosol en donde comienza la transcripción del preproTRH por los ribosomas; los 25 primeros aminoácidos dan lugar a un péptido señal que dirige a la proteína recién sintetizada hacia el lumen del retículo endoplásmico rugoso en donde esta secuencia es escindida, dando lugar a la proteína pro-TRH (Figura 5-B). Pro-TRH contiene cinco copias de la secuencia progenitora de TRH: glutamina (Gln) - histidina (His) - prolina (Pro) - glicina (Gly), más cuatro péptidos que no-TRH localizados entre las secuencias progenitoras y péptidos flanqueantes en los extremos N-terminal y C-terminal (27). El precursor proTRH es transportado del retículo endoplásmico a la red trans-Golgi, donde los péptidos N-terminales y C-terminales de proTRH son empaquetados junto a enzimas procesadoras en diferentes vesículas de la vía secretora (Fig. 5-C); estas enzimas llevan a cabo el último paso del procesamiento de TRH. Primero, las enzimas prohormona convertasa (PC) 1 y 2 escinden el extremo carboxilo de los aminoácidos básicos (Lisina (Lys)-Arginina (Arg) y Arginina (Arg) - Arginina (Arg)) que se encuentran flanqueando a las secuencias progenitoras de TRH (Figura 5-D). La carboxilpeptidasa E remueve dichos residuos básicos dejando únicamente la secuencia progenitora de TRH (Figura 5-E), Gln-His-Pro-Gly, la cual es posteriormente amidada por la peptidilglicina- $\alpha$ -monooxigenasa amidante (PAM) que usa a la Gly N-terminal como donadora del grupo amida (Figura 5-F). Finalmente, la Gly N-terminal es ciclada a piroglutamina por la piroglitaminasa, resultando en la forma madura de TRH (Figura 5-G) (Nillni, E. et al., 2010). El

procesamiento de proTRH de rata resulta en 5 copias de TRH y siete péptidos no-TRH.



*Figura 5. Biosíntesis de TRH. A) El proceso de síntesis inicia en el soma de la neurona. El transcrito primario de prepro-TRH (hnRNA) es sintetizado en el núcleo. B) El RNA maduro se transporta al citosol donde sucede la transcripción del mRNA de prepro-TRH. En el retículo endoplásmico se escinde el péptido señal, dando lugar a la proteína pro-TRH. C) los péptidos N-terminales y C-terminales de proTRH son empaquetados junto a enzimas procesadoras en vesículas. D) prohormona convertasa (PC) 1 y 2 escinden el extremo carboxilo de los aminoácidos básicos. E) . La carboxilpeptidasa E los residuos básicos dejando únicamente la secuencia progenitora de TRH. F) La secuencia progenitora es amidada por la peptidilglicina- $\alpha$ -monooxigenasa amidante (PAM). G) la Gly N-terminal es ciclada a piroglutamina por la piroglitaminasa, dando origen a TRH. Modificada de Joseph-Bravo et al. (2015a).*

## 2.5.2 PROMOTOR PROXIMAL DE TRH Y SU REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.

El promotor proximal del gen de pro-*Trh* (250 pares de bases río arriba de la caja TATA) contiene varios elementos de respuesta para FT específicos cuya actividad es modulada por varias señales y están involucrados en la regulación de la transcripción de *Trh*. El gen pro-*Trh* es inducible por GC, aunque carece de secuencias consenso del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) tiene varios medios sitios consenso ( $1/2$ GRE) (Figura 6-A). El  $1/2$ GRE se encuentra flanqueado en la cadena complementaria por secuencias del elemento de respuesta

a la proteína activadora 1 (AP1), formando un sitio GRE compuesto (cGRE) (Figura 6-B), a este sitio cGRE se une GR formando un heterodímero con cJun (Cote-Vélez et al., 2005; Díaz-Gallardo et al., 2010a).

Cerca del sitio TATA se encuentra un sitio denominado "Site 4" (TGACCTCA) que es un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (THRE (AGGTCA)), al cual se une el receptor de hormonas tiroideas (TR) (Figura 6-C). El elemento de respuesta a adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (CRE), reconocido por la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), está flanqueado por elementos de respuesta para los factores de la familia Sp/Kruppel (como SP-1), una secuencia rica en GC en el lado 5' y en el 3' la secuencia CACC (Diaz-Gallardo et al., 2010; Sotelo-Rivera et al., 2014); en conjunto se le conoce a esta región como CRE extendido (Figura 6-D). CREB es un activador transcripcional ubicuo, que una vez fosforilado (pCREB) se une a este sitio como homodímero o unido a otro FT relacionado. Se sabe que múltiples señales intracelulares son capaces de fosforilar a CREB en el núcleo.

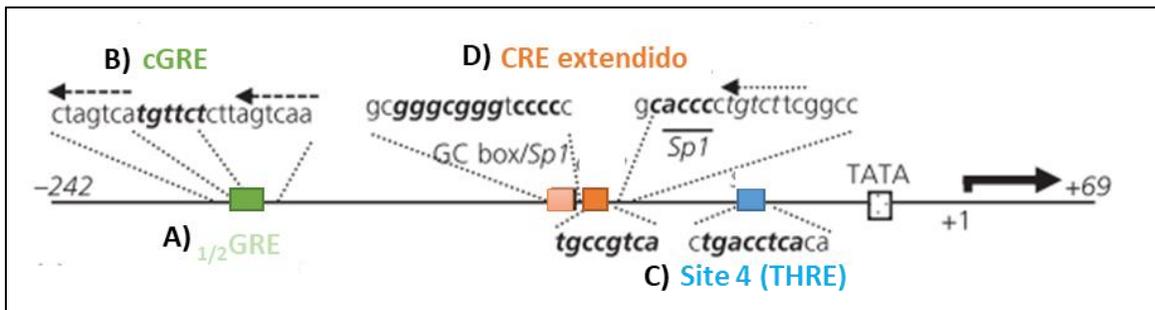


Figura 6. Organización del promotor del gen *Trh* de rata. A) La transcripción del gen es inducida por glucocorticoides por lo que el promotor cuenta con varios medios GRE ( $1/2$ GRE). B) El promotor del gen cuenta con GREs compuestos (cGRE), integrados por  $1/2$ GRE flanqueado por secuencias de reconocimiento para la proteína activadora 1 (AP1), C) El Site 4 se encuentra cerca de la caja TATA y contiene elementos de respuesta a hormonas tiroideas (THRE). D) La transcripción del gen puede ser inducida también por AMPc (adenosin monofosfato cíclico) ya que contiene un elemento de respuesta a AMPc (CRE) flanqueado por elementos de respuesta para factores de transcripción como SP-1, también por una secuencia rica en GC en el lado 5' y en el 3' por la secuencia CACC (CRE extendido, la forma fosforilada de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) reconoce dicho sitio. Modificada de Díaz-Gallardo et al., (2010).

La regulación de las neuronas TRHérgicas ocurre en respuesta a un estímulo; por ejemplo, el frío, estimula neuronas de la médula espinal y liberan NA en el PVN. La NA es un modulador hidrofílico que interactúa en la membrana y se une a su receptor membranal acoplado a proteína G, el dominio transmembranal de esta proteína activa a la enzima adenilato ciclasa que a su vez incrementa los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc), esto induce la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). PKA es un complejo tetramérico de dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras; AMPc activa a PKA uniéndose a las subunidades reguladoras, lo que causa la disociación y translocación nuclear de las subunidades catalíticas (PKAc). En el núcleo, PKAc fosforila a CREB el cual ya fosforilado se une a CRE, activando la transcripción (Figura 7).

Cultivos primarios de células hipotalámicas han permitido estudiar la regulación de la síntesis de TRH. La incubación con Fsk que activa al adenilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares de AMPc, o con análogos permeables de AMPc tales como el 8-bromo AMPc (8-BrAMPc) y el dibutilil-AMPc (db-AMPc), o inclusive con NA, incrementan los niveles de mRNA de *Trh*. En este sistema se caracterizó la unión de pCREB a CRE extendido del promotor del gen de *Trh* (Díaz-Gallardo et al., 2010).

La incubación de cultivos primarios de células hipotalámicas fetales mostró también un efecto estimulador de Dex en los niveles de mRNA de pro-TRH y la unión de GR al cGRE (Díaz-Gallardo et al., 2010). Sin embargo, la co-incubación de 8Br-AMPc con Dex reduce el efecto estimulador en la transcripción y en la unión de GR o pCREB al promotor, sugiriendo un antagonismo entre la estimulación de la vía de GC y la vía de PKA (Pérez-Martínez et al., 1998; Sotelo-Rivera et al., 2017). Recientemente se demostró por medio de co-inmunoprecipitaciones utilizando anticuerpos contra GR o PKAc en extractos citoplasmáticos y nucleares de células tratadas con db-AMPc, Dex, o ambas drogas juntas, que hay una interacción proteína:proteína entre GR y PKAc. Esta asociación promueve un mecanismo

rápido para disminuir la fosforilación de CREB y la transcripción de TRH ( Sotelo-Rivera et al., 2017) como se muestra en el modelo de la Figura 7.

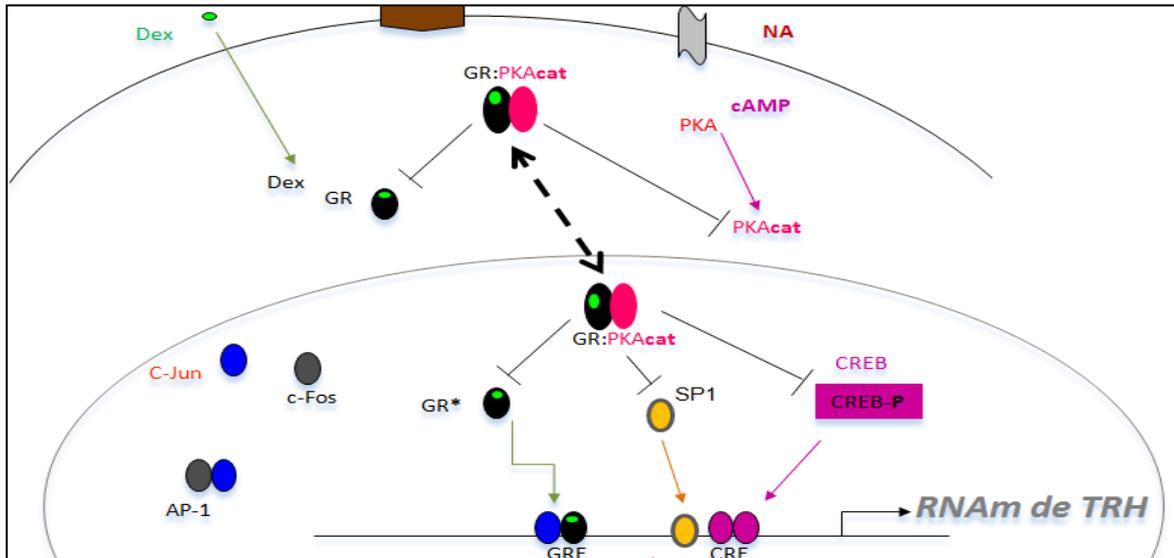


Figura 7. Modelo de la interferencia de los glucocorticoides y la vía de señalización de AMPc en la activación transcripcional del gen de pro-Trh. Tomada de la tesis de maestría de Sotelo-Rivera (2012).

### 3. ANTECEDENTES

Con el objetivo de estudiar si la interacción de GR con PKAc requiere de la proteína intacta se obtuvieron mutantes de GR (Figura 8) con las que se comparó su actividad transcripcional sobre la expresión del gen reportero TRH-luc (tesis de maestría de Sotelo Rivera, 2012).

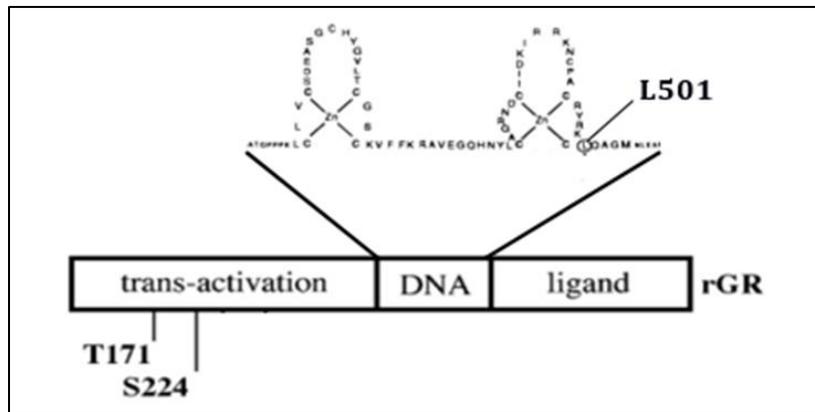


Figura 8. Localización de las modificaciones de GR. Modificada de Rogatsky et al., 1998 y Schena, et al., 1989.

Se co-transfectaron las mutantes, el GR-WT y los plásmidos reporteros, TRH-luc y  $\beta$ -gal, en células SH-SY5Y (derivadas de un neuroblastoma humano), se incubaron con Dex, AMPc y combinados. La estimulación por Dex se pierde al transfectar con la mutante de GR en el DBD (L501P) y GR-T171A mientras que la interferencia con AMPc se pierde con éstas y con GR-S224A (Figura 9). Estas mutantes pueden afectar la translocación nuclear y la interacción con co-reguladores, demostrando que estos sitios en GR son importantes para que se lleve a cabo el efecto de Dex tanto en la estimulación de la transcripción como en la interferencia con la vía de señalización de PKA (tesis de maestría de Sotelo-Rivera, 2012).

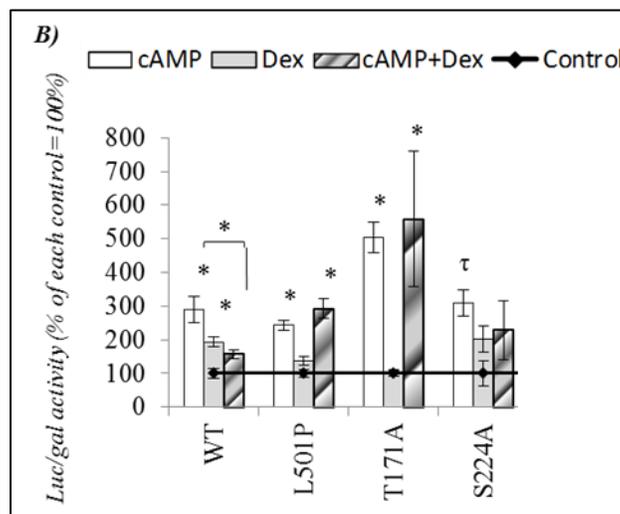


Figura 9. Efecto de GR-WT, GR-L501P, GR-S224A y GR-T171A sobre la actividad del gen reportero, bajo el estímulo de dexametasona (Dex), AMPc y Dex+ AMPc (. (Tesis maestría I. Sotelo-Rivera).

## 4. JUSTIFICACIÓN.

El análisis de los componentes estructurales del GR permitirá contribuir a entender el papel del sitio AF-1 y el DBD en la actividad transcripcional de GR y su interacción con PKAc.

## 5. HIPÓTESIS.

Las mutaciones en GR de los sitios AF-1 y DBD están alterando la localización subcelular de GR y/o la interacción entre GR y PKA

## 6. OBJETIVO GENERAL.

Comparar la eficiencia de transfección de las distintas mutantes de GR y su localización subcelular en respuesta a la estimulación por Dex y Fsk.

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✿ Transfectar la línea celular SH-SY5Y con GR silvestre y/o mutados.
- ✿ Determinar si las mutaciones de GR afectan su localización celular.
- ✿ Determinar si la incubación con Dex o Dex+Fsk afecta la localización celular de las mutantes de GR.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 8.1. *CULTIVO CELULAR.*

La línea celular SY-SH5Y (ATCC® CRL-2266™), proveniente de neuroblastoma humano, fueron cultivadas en placas de 100 mm (p100) en una combinación de medio DMEM (Dulbeco Modified Eagles Medium) y medio F12 (DMEM-F12), suplementado con 10% suero fetal bovino, 0.25% de glucosa, 2 mM de glutamina y la mezcla de antibiótico al 1%; el medio fue filtrado con un filtro de 0.22 µm. Las células fueron incubadas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, el medio se sustituyó cada tercer día hasta que se alcanzó una confluencia del 80-90% aproximadamente.

Las células se pasaron a placas de 35 mm (p35) retirando previamente el medio e incubando con 1.5 mL de tripsina-EDTA por 5 minutos a 37 °C. Las células desprendidas se recuperaron en un tubo falcon de 15 mL el cual se centrifugó a 1500 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente (TA). Se desechó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en 3 mL de medio DMEM-F12 suplementado. Se tomaron 50 µL de las células en suspensión y se mezclaron con 50 µL de azul de tripano para llevar a cabo el conteo de células totales (vivas y muertas). Se sembraron 800,000 células vivas en cada p35, previamente recubierta con poli-D-lisina. Finalmente, las células se diferenciaron por 7 días en medio DMEM-F12 5% SFB con  $1.6 \times 10^{-9}$  M de TPA (12-O-tetradecanoliforbol-13-acetato). La línea celular SH-SY5Y no expresa el mRNA de TRH, pero sí posee las vías de transducción involucradas en la señalización de GC, PKC y MAPK. Estos factores nucleares muestran características similares a los factores nucleares de cultivos hipotalámicos (Cote-Vélez et al., 2005; Cote-Vélez et al., 2008).

## 8.2. *TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.*

Al finalizar la diferenciación de las células SY-SH5Y, se sustituyó el medio DMEM-F12 suplementado por DMEM-F12 sin antibiótico con 5% de SFB. Al siguiente día el medio se volvió a sustituir el medio por DMEM-F12 no suplementado. Posteriormente, se prepararon las mezclas de transfección para dos cajas Petri de 60x15 mm con cada uno de los plásmidos (GR-WT o mutante, puc18, β-gal, TRH-luc) (Tabla 2) y la lipofectamina en medio DMEM-F12 no suplementado. Se colocó la mezcla de transfección a cada caja, como se indica en la Figura 10, y se dejó por

5 horas, pasado este tiempo se sustituyó la mezcla por medio DMEM-F12 5% SFB no suplementado. 48 horas después, las células se estimularon y cosecharon.

*Tabla 2. Plásmidos contenidos en la mezcla de transfección.*

| <b>Plásmidos</b> | <b>Descripción del plásmido y cantidad.</b>  |
|------------------|--|
| GR-WT            | 9600 ng. Plásmido de expresión del GR silvestre de rata, p6RGR-WT (GR-WT), fue donado por Dr. Albert (Marcin Boruk, 1998).   |
| GR-L501P         | 9600 ng. Plásmido p6RGR-L501P expresa al rGR con un cambio de leucina por prolina en la posición 501 de la secuencia lineal de aminoácidos, modificando al segundo dedo de zinc, lo cual daña el dominio de unión a DNA (Marcin Boruk, 1998).  |
| GR-S224A         | 9600 ng. Plásmido p6RGR-S224A mutante en el dominio N-terminal del rGR, tiene sustituida una serina 224 por una alanina. Donado por el Dr. Yamamoto (Iñiguez-Illuhí et al.1997)).  |
| GR-T171A         | 9600 ng. Plásmido p6RGR-T171A, mutante en el dominio N-terminal del rGR, la treonina 171 es sustituida por una alanina. Donado por el Dr. Yamamoto (Iñiguez-Illuhí et al.1997)).   |
| Puc18            | 7200 ng. Plásmido vacío utilizado para completar la carga requerida de DNA (800 ng), según el protocolo estándar de transfección.  |
| TRH-luc          | 3600 ng. Plásmido reportero pNASS-TRH-luc, permite la expresión de la luciferasa bajo el control del promotor de TRH. Donado por el Dr. Balkan (Geriatric Research, Education, and Clinical Center, USA).  |
| $\beta$ -gal     | 3600 ng. Plásmido reportero RSV- $\beta$ -gal utilizado como control interno de transfección, permite la expresión de la $\beta$ -galactosidasa bajo el control del promotor del virus del sarcoma de Rous. Donado por la Dra. Susana Castro (Instituto de Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, MEX) |

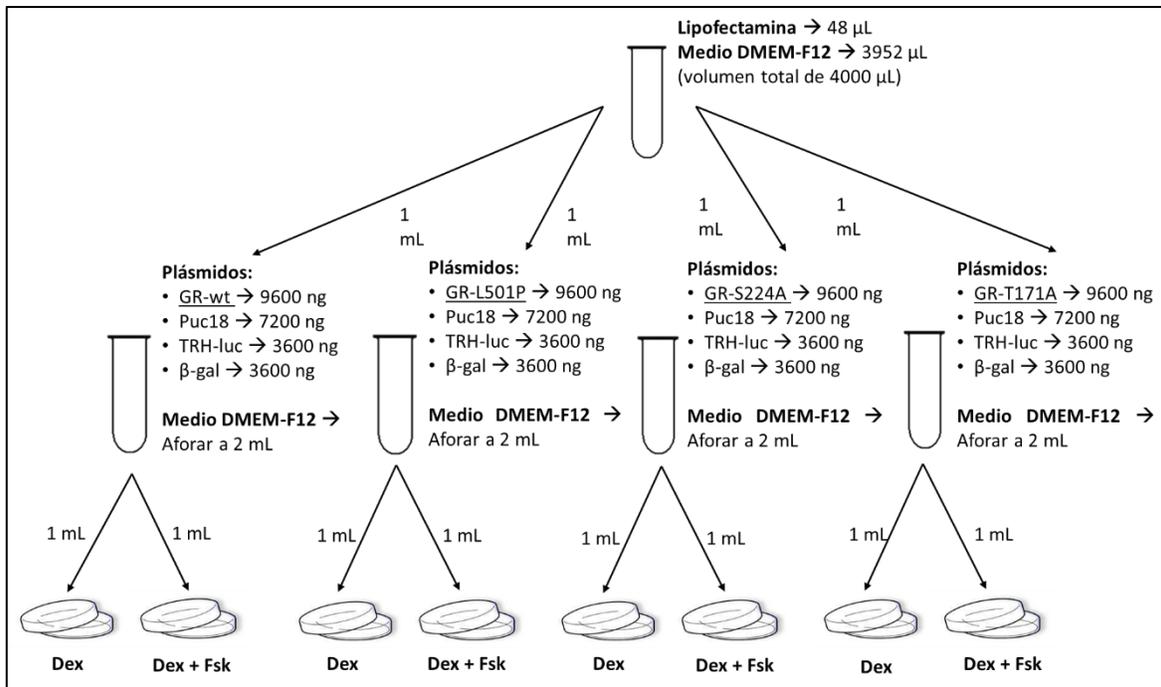


Figura 10. Transfección de la línea celular SH-SY5Y.

### 8.3. ESTIMULACIÓN Y COSECHA. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS Y NUCLEARES.

La mitad del medio fue reemplazada con una de las drogas disueltas en medio DMEM-F12 sin SFB a una concentración para dexametasona (Dex) de  $1 \times 10^{-7}$  M y para forskolina (Fsk) de  $1 \times 10^{-5}$  M, o con ambas drogas. Las células se incubaron con las drogas durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con 500  $\mu$ L de PBS 1x y se desprendieron del plato con el émbolo de una jeringa para ser recolectadas en un tubo falcon de 15 mL. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 7 minutos, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento de células en 200  $\mu$ L de buffer hipotónico y se lavó el tubo con 150  $\mu$ L más de buffer. La suspensión de células se transfirió a un tubo eppendorff en donde se incubaron a 4 °C por 20 minutos. Se les añadió 6  $\mu$ L de detergente tritón 10% y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante donde se encuentran las proteínas citoplasmáticas.

El sedimento se volvió a resuspender en 200  $\mu$ L de buffer hipertónico y se dejaron los tubos en agitación suave por 30 minutos a 4 °C. Transcurrido este tiempo los tubos se centrifugaron a 13,500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante se recuperó, ya que contiene a las proteínas nucleares. Se separaron alícuotas de 10  $\mu$ L para la cuantificación de proteínas.

#### 8.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó una curva estándar con concentraciones ascendentes a partir de un stock de 0.2 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA). A las muestras y a la curva estándar se les agregó 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford y se determinó su absorbancia a 595 nm.

#### 8.5. WESTERN BLOT

A las muestras conteniendo proteínas citosólicas o nucleares se les agregó el buffer de muestra 1X y se hirvieron durante 7 minutos. Se cargaron 40  $\mu$ l de proteína total en un gel a 10% Tris/Glicina SDS-Poliacrilamida que se corrió en buffer de corrida 100 voltios durante 2 horas, aproximadamente.

Una vez separadas las proteínas por electroforesis SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia a 100 voltios durante 75 minutos. Luego, la membrana se bloqueó con leche descremada al 6% durante 2 horas en agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo primario específico anti GR de conejo (H-300, sc-8992, Biotecnología Santa Cruz, California, USA) 1:500 en agitación a 4 °C toda la noche. Al siguiente día se lavó la membrana 3 veces durante 7 minutos con 10 mL de TBS-Tween 0.1% con leche descremada al 1%, seguido de 3 lavados de 7 minutos con TBS 1X. Enseguida, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a proteína A, en agitación por 75 minutos. Los lavados descritos antes, con TBS-Tween 0.1% con leche al 1% y TBS 1X, se repitieron. Finalmente, la membrana se reveló con la solución quimioluminiscente para luego ser expuesta a una película autorradiográfica durante 45 minutos.

### 8.6. STRIPPING PARA LA REUTILIZACIÓN DE MEMBRANAS.

Para reutilizar la membrana e incubarla con otros anticuerpos se preparó una solución de stripping. La solución de stripping se calentó a 60°C y se sumergió en ella la membrana durante 30 minutos en agitación suave. Pasado este tiempo, las membranas se lavaron 3 veces con 10 mL de TBS-Tween 0.1% a temperatura ambiente y en agitación por 5 minutos en agitación. Después de los lavados, la membrana se bloqueó nuevamente con leche descremada al 6% durante 2 horas. Finalmente, la membrana quedó lista para incubarla con anti Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de conejo (14C10, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 1:2500 y luego de otro Stripping contra c-Fos de conejo (K-25: sc-253, Biotecnología Santa Cruz, California, USA) 1:1500.

## 9. RESULTADOS.

### 9.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN.

Para encontrar la cantidad de proteína total y concentración de GR transfectado que permita una óptima detección de la señal se realizó un cultivo de la línea celular SH-SY5Y, el cual fue transfectado transitoriamente con diferentes concentraciones de GR silvestre (GR-WT): 0 µg (-GR), 1.5 µg, 2 µg y 2.5 µg. En el Western Blot (WB) de los extractos celulares se cargó 40 µg.

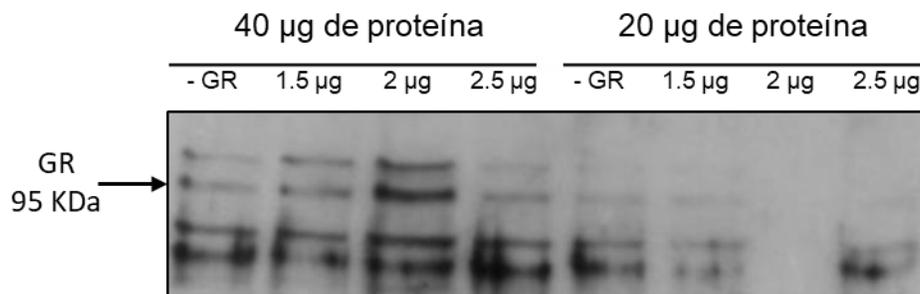


Figura 11. Señal de diferentes concentraciones de GR-WT transfectadas presentes en 40 µg y 20 µg de proteína total cargados en el WB

Como se observa en la Figura 11, la señal se ve mejor cuando se transfecta con 2  $\mu\text{g}$  de GR y se cargan 40  $\mu\text{g}$  de proteína total. Sin embargo, la banda sin señal correspondiente a 2  $\mu\text{g}$ , al cargar el gel con 20  $\mu\text{g}$ , indica tal vez un error durante la transfección o al momento de cargar el gel. Lo ideal sería que se viera una banda con la mitad de intensidad que la de 2  $\mu\text{g}$  con 40  $\mu\text{g}$  de proteína.

## 9.2. *SH-SY5Y* EXPRESA BAJAS CANTIDADES DE GR ENDÓGENO.

Para eliminar el posible enmascaramiento entre el GR endógeno de la línea celular y los GR transfectados de los plásmidos, se hizo un WB de células SH-SY5Y transfectadas con GR-WT y células SH-SY5Y no transfectadas.

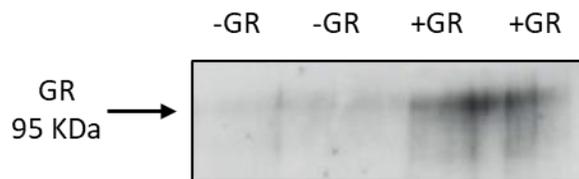


Figura 12. Comparación de células SH-SY5Y transfectada con GR-WT (+GR) y células SH-SY5Y no transfectadas (-GR).

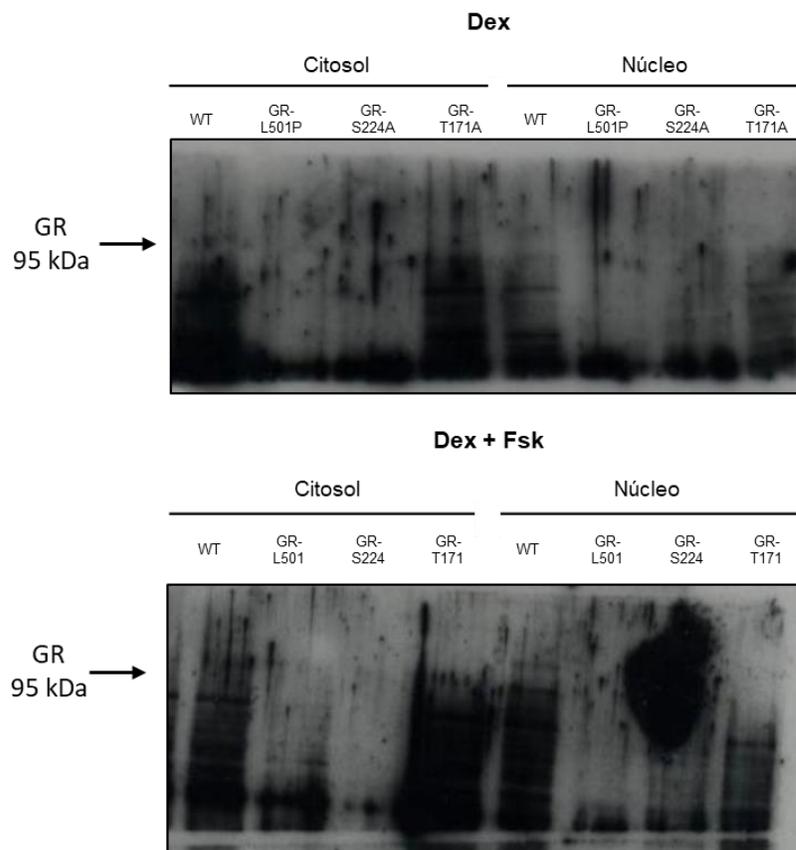
En la Figura 12 se ve una la señal es casi imperceptible en la región correspondiente a las células SH-SY5Y no transfectadas, lo que indica que GR endógeno se expresa a concentraciones muy bajas comparado a la señal de la célula transfectada.

## 9.3. EXPRESIÓN DE MUTANTES DE GR BAJO ESTIMULACIÓN DE DEXAMETASONA Y DE DEXAMETASONA+FORSKOLINA.

Una vez que se estandarizaron las condiciones de transfección, una serie de diferentes cultivos celulares de SH-SY5Y fueron transfectados con GR-WT o las mutantes (GR-L501P, GR-S224A, GR-T171A) y estimulados durante una hora con Dex [ $1 \times 10^{-7}$  M] o con Dex [ $1 \times 10^{-7}$  M] + Fsk [ $1 \times 10^{-5}$  M] para finalmente ser cosechados. Para ver el efecto del estímulo en la localización celular de GR-WT y las mutantes fue necesario separar los extractos celulares citoplasmáticos de los nucleares durante la cosecha de cada uno de los cultivos celulares. Utilizando los

extractos celulares obtenidos se realizó una serie de WB. Debido a la cosecha insuficiente de proteína total solo fue posible realizar un WB por cada cultivo.

En el WB del primer cultivo se obtuvo un blot con bandas inespecíficas y ruido de fondo (Figura 13).



*Figura 13. WB de proteínas citosólicas y nucleares del primer cultivo estimulado durante una hora con Dex [1x10<sup>-7</sup> M] o con Dex [1x10<sup>-7</sup> M] + Fsk [1x10<sup>-5</sup> M]. Se observa gran cantidad de bandas inespecíficas y ruido de fondo.*

Mejorando las condiciones del WB para el segundo cultivo, solo se obtuvo señal en el blot de las proteínas nucleares. La presencia de una burbuja de aire entre la membrana y el gel durante la transferencia dio lugar a la formación de una burbuja que interfiere con la señal de las bandas de interés en dos carriles (Figura 144).

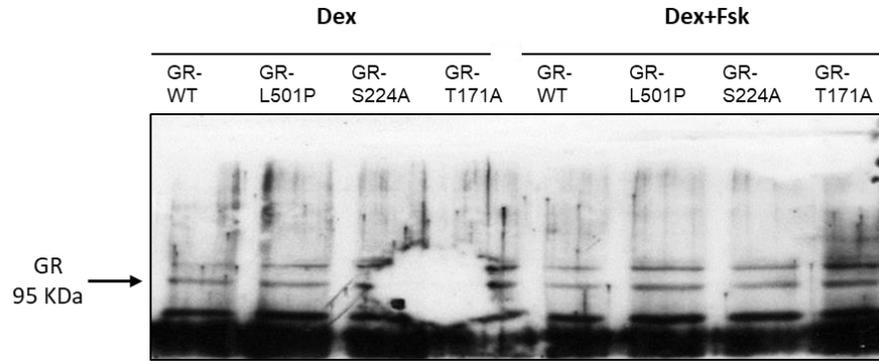
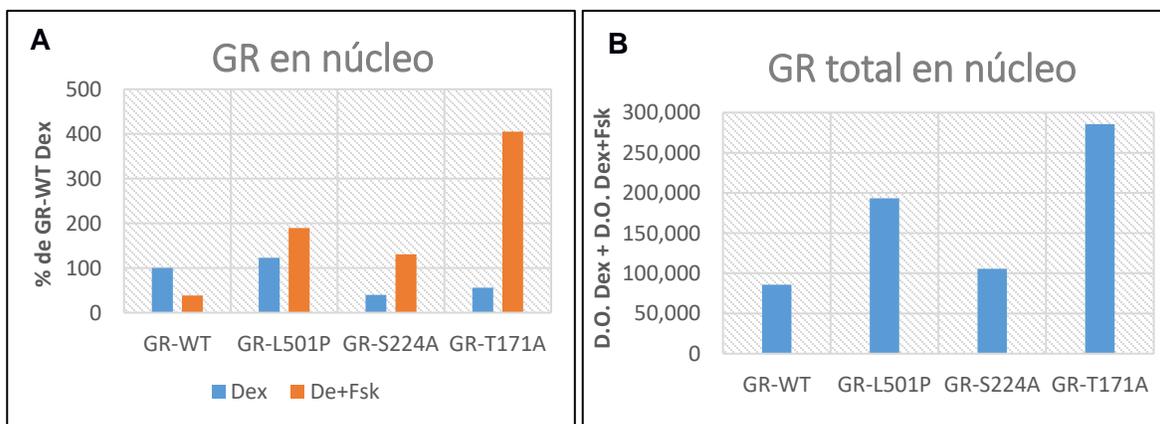


Figura 14. WB de proteínas nucleares del segundo cultivo celular estimulado por una hora con Dex [ $1 \times 10^{-7}$  M] y con Dex [ $1 \times 10^{-7}$  M] + Fsk [ $1 \times 10^{-5}$  M]. Se reveló contra GR y se observa en el blot las bandas correspondientes a GR-WT y mutantes en el peso molecular correspondiente a 95 KDa más otras bandas inespecíficas y la burbuja que se formó durante la transferencia.

Para analizar de manera objetiva la señal obtenida en los blots, se utilizaron métodos densitométricos para medir la cantidad relativa de proteína (MacPhee, 2010). Por medio del equipo de análisis y documentación de geles, Gel Doc™ XR System (Biorad®), se obtuvo un valor de densidad óptica (D.O.) para la señal de GR.

En la Figura 15-A se compara la D.O. de GR-WT y las mutantes entre los diferentes tratamientos y en la Figura 15-B se graficó la suma de la D.O. dada para la señal de GR-WT y mutantes estimulados con Dex más la señal de GR-WT y mutantes estimulados con Dex+Fsk. En el caso de las bandas donde se encontró una burbuja, se analizó un cuadro que comprendiera el espacio de señal y ese mismo cuadro se colocó en las otras bandas para así establecer una comparación adecuada.



*Figura 15. Densidad óptica (D.O.) obtenida para el WB de las proteínas nucleares del segundo cultivo. A) D.O. de la señal dada por cada GR transfectado y tratado con Dex y Dex+Fsk. Se muestra el porcentaje (%) respecto a GR-WT estimulado con Dex=100%. B) Sumatoria de la D.O. de la señal de GR con Dex más la D.O. de la señal de GR con Dex+Fsk.*

Pese a los problemas que presenta el WB del segundo cultivo, los datos de densidad óptica sugieren que las células fueron exitosamente transfectadas. Sin embargo, dadas las diferencias en la señal total (GR con Dex más GR con Dex+Fsk) de cada GR transfectado (Figura 15-B) se sugiere que la transfección ocurrió con diferente eficiencia. Al no tener los datos de las proteínas del citosol no podemos evaluar la proporción que se translocó al núcleo para cada plásmido y tratamiento. Falta, además, un marcador que nos indique la cantidad de proteína nuclear depositada en el gel y transferida a la membrana para poder calcular la eficiencia de cada plásmido. Como se trata del mismo cultivo, es posible comparar para un mismo plásmido su presencia en los cultivos estimulados con Dex o con Dex+Fsk; el cultivo transfectado con el GR-WT es el único que presenta una menor cantidad cuando se incubaba con Dex+Fsk comparado a Dex que podría ser debido a una interferencia en activar a GR como fue observado en el trabajo de Sotelo-Rivera (Tesis de maestría, 2012). Otra posible explicación al resultado de la Figura 15 (A y B) es que, durante la cosecha hay eventos que influyen en la cantidad de proteína obtenida, lo que podría reflejarse en las diferencias de la señal total detectada por el anticuerpo o bien, que la activación por Dex o Fsk cambia diferencialmente la capacidad de reconocimiento del GR mutado por el anticuerpo. El anticuerpo utilizado reconoce la región de GR entre 121 y 140; las mutantes GR-S224A y GR-T171A presentan modificaciones en esta región por lo que pudieran tener afinidades distintas que dificultan aún más un cálculo preciso de eficiencia de transfección entre ellos.

Con el objetivo de aumentar la cantidad de proteína cosechada, se realizaron nuevos cultivos. Se utilizó un cultivo diferente para cada estímulo. Uno de los cultivos fue estimulado con Dex (cultivo 3) y el otro con Dex+Fsk (cultivo 4). Siguiendo con la intención de mejorar los resultados obtenidos en este experimento, se cuidó que las proteínas citosólicas no contaminaran los extractos nucleares, y

viceversa, mediante un lavado extra con buffer hipotónico durante la extracción de las proteínas del citosol.

Con los extractos proteicos del citosol y del núcleo de los cultivos 3 y 4 se realizó el tercer WB en el que además de evaluar la localización de las mutantes transfectadas de GR, también se evaluó la contaminación de la señal, es decir, la presencia de proteínas nucleares en el citosol y de proteínas citosólicas en el núcleo, para ambos cultivos. Esto se hizo mediante el “stripping” de las membranas incubadas y reveladas contra el GR para después incubarlas y revelarlas contra la GAPDH (una proteína exclusiva del citosol) y luego de otro “stripping” contra c-Fos (una proteína preferentemente localizada en núcleo). En la Figura 16 se muestran los blots obtenidos de las membranas del WB y sus consecutivos “stripping”. El blot correspondiente a las proteínas citosólicas da señal para GAPDH, pero no para c-Fos (Figura 16-A); respaldando lo anterior, el blot de las proteínas nucleares da señal para c-Fos, pero no para GAPDH (Figura 16-B). En este experimento se demostró que la presencia de GR en el citosol no se debía a la contaminación del GR nuclear o viceversa.

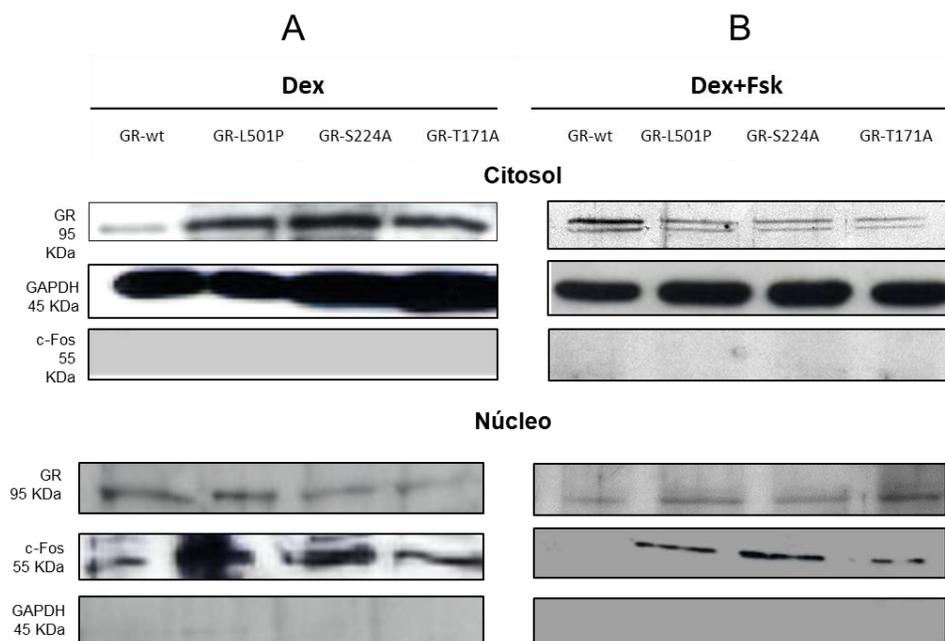


Figura 16. Expresión nuclear y citosólica de GR (95 kDa), GAPDH (45 KDa) y c-Fos (55 KDa) de cultivos estimulados durante una hora con Dex [ $1 \times 10^{-7}$  M] o con Dex [ $1 \times 10^{-7}$  M] + Fsk [ $1 \times 10^{-5}$  M]. Este es un WB representativos de la tendencia general observada en este trabajo.

La Figura 17 muestra los datos correspondientes a la localización subcelular de GR-WT y mutantes con Dex. En la gráfica se calculó el porcentaje (%) de la D.O. de la señal de GR (GR-WT y mutantes) tomando como el 100% la suma de la D.O. de la señal detectada en citosol + la D.O. de la señal detectada en núcleo. Al calcular en % del total de señal para cada plásmido corregimos las diferencias en eficiencia de transfección y podemos evaluar la proporción que pasa a núcleo contra la que se queda en citosol. Estos datos sugieren que el GR-WT se transloca a núcleo mejor que cualquiera de los otros plásmidos y, el GR-T171A, mucho menor.

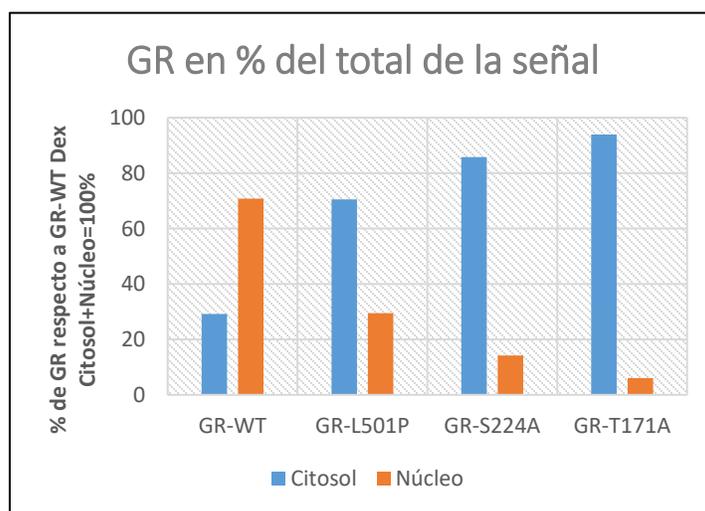


Figura 17. D.O. de GR-WT y mutantes presentada como % de GR-WT estimulado con Dex en citosol + GR-WT estimulado con Dex núcleo=100%.

Tomando en cuenta los marcadores que permiten evaluar la cantidad relativa de proteína, se calculó la relación entre el GR y el marcador citosólico GPDH, o nuclear cFos. Debido a la diferencia en la expresión de estos marcadores no se puede sumar la señal de citosol + núcleo, por lo que solo se calculó el porcentaje respecto a la señal relativa de GR-WT; se optó por calcular contra el GR-WT y no contra la señal del GR endógeno que fue muy débil en el cultivo 3. Es importante destacar que se comparó la cantidad relativa del GR entre compartimentos de un mismo tratamiento porque cada tratamiento corresponde a un cultivo diferente (Figura 18).

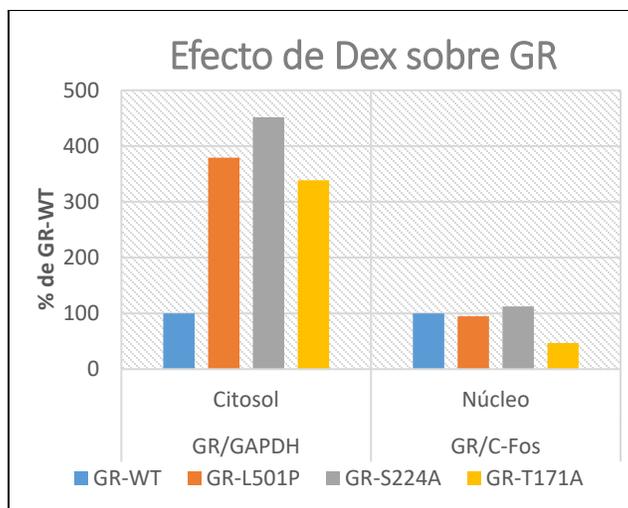


Figura 18. Distribución de la D.O. de los blots obtenidos en el WB de las proteínas citosólicas y nucleares del cultivo estimulado con Dex, calculando la señal de GR/marcador.

La estimulación con Dex+Fsk se realizó en un cultivo distinto en el cual la señal en general fue más débil.

En el caso de GR-WT, Dex fomentaría su translocación al núcleo y la co-estimulación de Dex+Fsk interferiría con su correcta translocación al núcleo si la interacción se da en el citosol. En la Figura 18 puede apreciarse que en respuesta a Dex, la presencia de GR-WT aumenta en el núcleo, más de lo que se observa con las mutantes. La co-incubación de Dex+Fsk, aun cuando la cantidad recuperada es menor que en el cultivo anterior estimulado con Dex, permite observar niveles similares de GR-WT y GR-T171A en ambos compartimentos y una menor cantidad de GR-S224A y GR-L501P en el núcleo en comparación con el citosol.

Debido a que dos de los cultivos en los que se incubaron las células con Dex+Fsk presentaron problemas en los que, en uno, la transfección con dos plásmidos fue deficiente y el otro, como se muestra en la Figura 16, no presenta señal de cFos lo que impide calcular la señal relativa. Se calculó en % de la señal de GR tomando como 100% la señal de GR-WT en cada compartimento en el cultivo estimulado con Dex y en el cultivo estimulado con Dex+Fsk (Figuras 19-A y B).

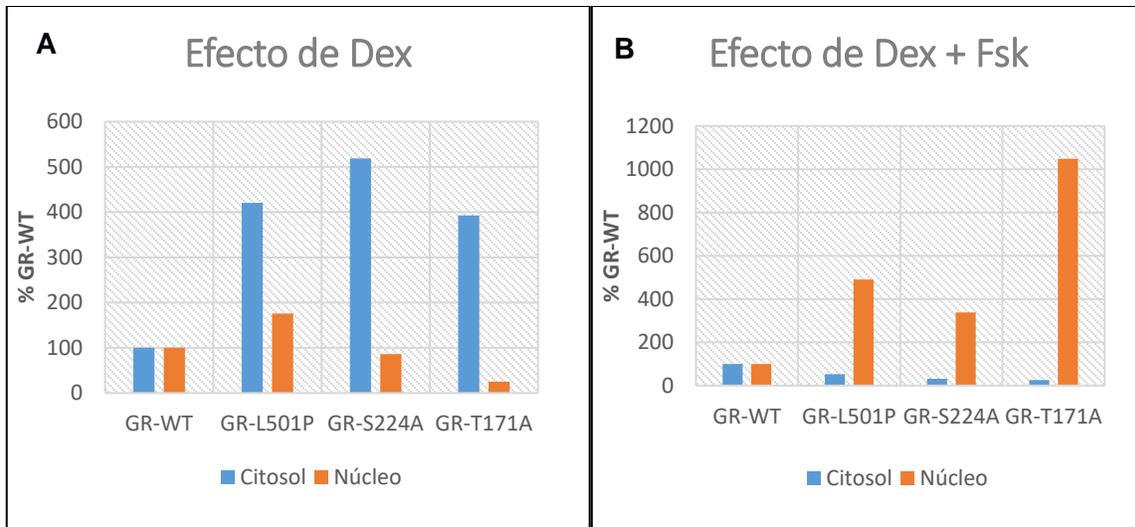


Figura 19. Densidad óptica de GR respecto a GR-WT=100%. A) Densidad óptica de GR en el cultivo estimulado con Dex; B) Densidad óptica de GR en el cultivo estimulado con Dex+Fsk.

Las Figuras 19-A y B sugieren que:

- Todos los plásmidos son transfectados, aunque no fue posible calcular la eficiencia de transfección.
- La distribución de los plásmidos en núcleo, de células incubadas con Dex, es mayor para GR-WT y GR-L501P comparado a GR-224A y GR-T171A que fue el menor. Lo contrario se observa en las células incubadas con Dex+Fsk que presentan un máximo de concentración en núcleo de la mutante GR-T171A y menor de GR-WT.

Como se mencionó en la Figura 15, la eficiencia de la transfección, de la cosecha de proteínas y de posibles diferencias de afinidad de las mutantes hacia el anticuerpo de GR, podría influir en la cantidad de GR detectado.

## 10. DISCUSIÓN

Con respecto a los aspectos técnicos, durante el desarrollo del trabajo se presentaron varias complicaciones con las técnicas experimentales. La primera fue durante la cosecha de las proteínas porque la cuantificación de la proteína mostraba

una cantidad insuficiente para completar los 40  $\mu\text{g}$  que se necesitaban cargar en el WB. Debido a este problema se optó por realizar los cultivos en cajas Petri de 60 mm, en lugar de las de 35 mm; de esta manera la proteína cosechada quedaría menos diluida. Al realizar WB de las proteínas cosechadas hubo casos en los que no se detectó señal en algunas de las membranas (Figura 14). La ausencia de señal podría deberse a varias razones: a) mala centrifugación o cuantificación de la proteína, b) problema en la dilución del anticuerpo, c) ausencia o bajas concentraciones de antígeno, d) las soluciones usadas (lavados prolongados) (Mahmood & Yang, 2012). El anticuerpo usado ya había sido evaluado anteriormente y es el mismo que se usó en otros experimentos que forman parte de los antecedentes del presente trabajo; los buffers eran preparados cuidadosamente y siguiendo el mismo protocolo en todas las repeticiones. El problema de contaminación por centrifugaciones deficientes se resolvió evaluando la proteína citosólica GAPDH o la nuclear c-Fos. Por tanto, el problema de la ausencia de señal recae en la ausencia o baja concentración del antígeno (GR). Otro problema detectado en el WB fue la presencia de bandas inespecíficas en las membranas donde sí había señal. Uno de las razones por las que podría haber ocurrido esto es por la degradación de las proteínas por proteasas (Mahmood & Yang, 2012); aunque las muestras eran frescas y el buffer con los que se realizó la cosecha contenían inhibidores de proteasas, un descuido en el tratamiento de las muestras pudo haber causado el problema.

Finalmente, es importante tomar en cuenta que los datos obtenidos en un WB son semicuantitativos. Esto se debe a que proporciona una comparación relativa de los niveles de proteína, no una medida absoluta de la cantidad (Mahmood & Yang, 2012), por lo que se pueden utilizar métodos densitométricos para medir la cantidad relativa de proteína (MacPhee, 2010). Para contender con estos problemas se calculó la relación entre GR y el marcador citosólico o nuclear.

Con respecto a los resultados obtenidos, la activación de GR inducida por Dex se da por la fosforilación de varios residuos involucrados en la translocación nuclear de GR, en su habilidad para formar homodímeros o heterodímeros con factores de

transcripción, o en el reconocimiento del GRE. En este trabajo se estudió la localización subcelular de mutantes de GR estimuladas con Dex y con Dex+Fsk.

De acuerdo los resultados de este trabajo, en donde GR-WT está más presente en el núcleo cuando se estimula con Dex (Figura 16-A), y a lo observado en la actividad del reportero TRH-luc inducido por Dex con GR-WT (Tesis de maestría de Sotelo-Rivera, 2012) (Figura 9), se sugiere que GR-WT esta translocando al núcleo de acuerdo con el modelo clásico. Cuando GR-WT se estimula con Dex+Fsk (Figura 16-B) los niveles de proteína son similares en citosol y núcleo, lo que no corresponde con su actividad transcripcional (Tesis de maestría Sotelo-Rivera, 2012) (Figura 9). En este caso, al disminuir la actividad transcripcional de GR y no tener ninguna mutación que impida su translocación, su presencia en el citosol debería ser mayor que en el núcleo.

Como se mencionó previamente, el promotor del gen *pro-Trh* contiene un GRE compuesto y al estimular conjuntamente la vía de los glucocorticoides y la vía de AMPc se da una interferencia que impide la transcripción del gen (Cote-Vélez et al., 2005; Pérez-Martínez et al., 1998), dicha interferencia sucede como consecuencia de la interacción proteína:proteína entre GR y PKAc y, por evidencias citológicas, también se observa que esta interacción evita la adecuada translocación de GR o de PKAc al núcleo (Sotelo-Rivera *et al.*, 2017). Los resultados mostrados en la Figura 16, en donde GR-WT está presente en el núcleo en la misma proporción que en el citosol, tanto en los incubados con Dex como Dex+Fsk no concuerdan con lo detectado por inmunocitoquímica de células completas (Tesis de maestría de Sotelo-Rivera, 2012) donde se demuestra que GR endógeno está presente en el núcleo de células incubadas con Dex, pero muy poco en aquellas incubadas con Dex+Fsk. Estas diferencias pueden deberse a un problema en la concentración, mientras que GR endógeno pudiera ser suficiente para atrapar a PKAc en el citosol y evitar así su translocación, como se mostró en la Figura 12, la concentración del GR transfectado es mucho mayor que el endógeno. Estos resultados sugieren que la interferencia de Dex con la señalización de PKA en la transcripción de Luc-TRH

observado en la Figura 9 no se debe a un problema de atrapamiento de GR y de PKAc en citosol. Habrá que demostrar qué ocurre con la PKAc a través de una co-inmunocitoquímica o una co-inmunoprecipitación

La unión del GR al DNA requerida para la transcripción inducida por Dex de TRH-luc fue confirmada con la mutante GR-L501P (Figura 9) la cual no mostró respuesta a Dex, pero si aumentó la transcripción del gen reportero bajo el estímulo Dex+Fsk, sugiriendo que esta mutante elimina la interferencia entre las vías de AMPc y GC permitiendo el efecto de PKAc (Tesis de maestría Sotelo-Rivera, 2012). Como la L501 no participa en la translocación de GR, se esperaba que su localización subcelular no cambiara con ninguno de los dos estímulos, sin embargo, en este trabajo se encontró que con Dex, gran parte de la proteína se quedó en el citosol. Este resultado podría sugerir que el dominio de unión al DNA podría estar interfiriendo con la localización de GR ya que se encuentra en la región bisagra (HR), que también participa en la translocación nuclear y se encuentra cerca de la mutación L501.

La mutante GR-T171A se mantuvo predominantemente en el citosol con Dex (Figura 16-A) y su presencia en el núcleo no aumento con Dex+Fsk (Figura 16-B). En cuanto a su actividad transcripcional (Figura 9) (Tesis de maestría Sotelo-Rivera, 2012) la expresión del gen reportero con GR-T171A no responde al estímulo de Dex, pero si lo hace a AMPc; tal comportamiento permite sugerir que la mutación impide que GR interaccione con PKAc, por lo que la respuesta transcripcional del gen reportero con GR-T171A se debe únicamente a la acción de la PKAc (Tesis de maestría Sotelo-Rivera, 2012).

Por otra parte, la mutante GR-S224A, al igual que GR-T171, presenta una mayor presencia en el citosol con Dex (Figura 16-A), lo mismo que sucede con Dex+Fsk, aunque en menor medida. Este resultado era esperado dada la importancia de S224 para la fosforilación de S232, un residuo que promueve la translocación nuclear de GR y su actividad transcripcional (Popovic et al., 2010). La actividad transcripcional de GR-S224A no muestra cambios significativos entre ambos estímulos, sugiriendo

que dicha mutante mantiene la interferencia (Figura 9) (Tesis de maestría Sotelo-Rivera, 2012). Comparando ambos resultados, se tiene que la localización de la mutante no apoya lo observado en su actividad transcripcional. Una posible explicación de esto es que la mutación solo podría estar afectando su localización celular, pero no su interacción con PKAc, por lo que el complejo GR-PKAc podría ser detectado tanto en el núcleo como en el citosol. Faltaría confirmar esto mediante una co-inmunoprecipitación.

Otra posible explicación sobre la presencia en el núcleo de la mutante, a pesar de la interdependencia que existe entre la fosforilación de S224 y S232 para la translocación nuclear de GR, está dada por lo que sugieren Ismaili y Garabedian (2004) que demostraron que la mutante GR-S224A no impedía la fosforilación de S232 ni su translocación. Esto podría estar pasando también en este trabajo, al igual en el realizado por Webster (1997) y en donde observó lo mismo.

Finalmente, la disminución de la presencia de las mutantes en el citosol al ser estimuladas con Dex+Fsk y al compararlas con la señal de GR endógeno podría deberse a la degradación por proteosomas. GR hiperfosforilado es marcado para su degradación por proteosoma (Wallace & Cidlowski, 2001) y dicha fosforilación podría darse por la PKAc, como se muestra en trabajos previos con otros modelos, donde la fosforilación de GR por PKAc fue sugerida *in vitro* pero nunca fue confirmada *in vivo* (Haske, et al., 1994; Rangarajan, et al., 1992). Se ha mostrado también que el transporte nuclear está ligado a la degradación de la proteína (Liu, 2000), y en el caso particular de S224, la mutante no impide la fosforilación del residuo S246, cuya función es promover el transporte nuclear.

## 11. CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis son preliminares pero prometedores ya que sugieren que los residuos T171 y L501, con base en los resultados de su actividad transcripcional (Tesis de maestría Sotelo-Rivera, 2012), son importantes

para la interacción con PKAc ya que se libera la interferencia observada bajo la incubación con Dex+Fsk; también podrían ser importantes para la localización celular de GR. La fosforilación de S224 es importante para la localización celular de GR y para su vida media, pero no parece afectar la posible interacción de GR con PKAc.

Para tener conclusiones definitivas, es importante repetir los cultivos, las transfecciones, las cosechas y los WB, para verificar los resultados y refuercen lo concluido en esta tesis.

## 12. ANEXOS.

### 12.1. ABREVIATURAS.

|           |  |
|-----------|--|
| 1/2GRE    | Medio elemento de respuesta a glucocorticoides                       |
| 8-br-AMPC | 8 bromo AMPC   |
| ACTH      | Adrenocorticotropina   |
| ADR       | Adrenalina   |
| AF-1      | Dominio de función de activación 1                                   |
| AF-2      | Dominio de función de activación 2                                   |
| AMPC      | Adenosin monofosfato cíclico   |
| AP-1      | Proteína activadora 1  |
| Arg       | Arginina   |
| CDK       | Cinasa dependientes de ciclina                                       |
| cGRE      | Elemento de respuesta a glucocorticoides compuesto                   |
| COUP-TFII | Factor de transcripción del promotor de ovoalbúmina de pollo tipo II |
| CRE       | Elemento de respuesta a AMPC   |
| CREB      | Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPC                    |
| CRH       | Hormona liberadora de corticotropina                                 |

|                     |  |
|---------------------|--|
| Cyp-40              | Ciclofilina 40                           |
| DBD                 | Dominio de unión a DNA                   |
| DMEM                | Dulbecco Modified Eagles Medium          |
| db-AMP <sub>c</sub> | Dibutiril AMP cíclico                    |
| FKBPs               | Proteínas de unión a FK506               |
| FT                  | Factores de transcripción                |
| GAPDH               | Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa  |
| GC                  | Glucocorticoides                         |
| Gln                 | Glutamina                                |
| Gly                 | Glicina                                  |
| GRE                 | Elemento de respuesta a glucocorticoides |
| GR                  | Receptor de glucocorticoides             |
| GSK3                | Cinasa glicógeno sintasa 3               |
| GST                 | Glutación S-transferasa                  |
| His                 | Histidina                                |
| hGR                 | Receptor de glucocorticoides de humano   |
| HPA                 | Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides           |
| HSP                 | Proteínas de choque térmico              |
| HT                  | Hormonas tiroideas                       |
| JNK                 | C-Jun N-terminal cinasa                  |
| LBD                 | Dominio de unión al ligando              |
| MAPK                | Cinasa dependiente de mitógeno           |
| mGR                 | Receptor de glucocorticoides de ratón    |
| MMTV                | Virus del tumor mamario de ratón         |
| MR                  | Receptor de mineralocorticoides          |

|                   |   |
|-------------------|---|
| NA                | Noradrenalina   |
| NF- $\kappa\beta$ | Factor nuclear $\kappa\beta$  |
| nGRE              | Elemento de respuesta a glucocorticoides negativo                                   |
| NLS 1             | Señal de translocación nuclear 1  |
| NLS 2             | Señal de translocación nuclear 2  |
| Oct-1             | Transportador de cationes orgánicos 1   |
| PC                | Prohormona convertasa   |
| pCREB             | Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc fosforilada                       |
| PKA               | Proteína cinasa dependiente de AMPc   |
| PKAc              | Subunidad catalítica de PKA   |
| Pomc              | pro-opiomelanocortina   |
| Pro               | Prolina   |
| PVN               | Núcleo paraventricular  |
| rGR               | Receptor de glucocorticoides de rata  |
| SMRT              | Mediador del silenciamiento de receptores del ácido retinoico y de hormona tiroidea |
| SNC               | Sistema nervioso central  |
| STAT3             | Activador de la transcripción 3   |
| STAT5             | Activador de la transcripción 5   |
| T4                | 3,5,3',5'-tetraiodotironina   |
| T3                | 3,5,3'-triiodotironina  |
| TA                | Temperatura ambiente  |
| THRE              | Elemento de respuesta a hormonas tiroideas  |
| TPA               | 12-O-tetradecanoliforbol-13-acetato   |
| TR $\alpha$       | Receptor de hormona tiroidea $\alpha$   |
| TR $\beta$        | Receptor de hormona tiroidea $\beta$  |

|              |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| TR $\beta$ 2 | Isoforma 2 del receptor $\beta$   |
| TRH          | Hormona liberadora de tirotropina |
| TSH          | Tirotropina                       |

## 12.2. COMPOSICIÓN DE BUFFERS UTILIZADOS.

### ✓ DMEM (1L)

- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) 3.7 g
- Glucosa 3.5 g
- pH a 7

### ✓ F-12 (1L)

- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) 1.76 g
- pH 7

### ✓ PBS 1x (1L)

- Cloruro de potasio (KCL) 0.2 g
- Fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.195 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 8.12 g
- Fosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.97 g
- Ajustar el pH a 7.2

### ✓ Buffer hipotónico

- 1x Complete ("protease inhibitor cocktail tablets" 50X en 1 mL)
- 2 mM Ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)
- 10 nM Cloruro de sodio (NaF)
- 10 mM Butirato de sodio

### ✓ Buffer hipertónico

- 1x Complete ("protease inhibitor cocktail tablets" 50X en 1 mL)
- 2 mM Ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)
- 10 nM Cloruro de sodio (NaF)
- 0.01 M Tritón 10%

### ✓ Tris-Gly 1X

- 25 mM Tris base (trizma)
- 192 mM Glicina

- ✓ **TBS 10X**
  - 25 mM Tris HCl, pH 8.0
  - 190 mM NaCl
- ✓ **TBS-Tween 0.01% (0.5L)**
  - TBS 10X 50 mL
  - H<sub>2</sub>O 450 mL
  - Tween 500µL
- ✓ **Buffer de muestra**
  - 125 mM Tris-HCl
  - 8% SDS
  - 10% β-mercaptoetanol
  - 17.5% glicerol
  - 1x Complete ("protease inhibitor cocktail tablets" 50X en 1 mL)
- ✓ **Buffer de transferencia (1L)**
  - Tris-Gly 10X 100 mL
  - Metanol 200 mL
  - H<sub>2</sub>O 700 mL
- ✓ **Buffer de corrida (1L)**
  - Tris-Gly 10x 100 mL
  - SDS 10% 10 mL
  - H<sub>2</sub>O 890 mL
- ✓ **Solución de Stripping**
  - 62.5 mM Tris-HCl pH 7.5
  - 100 mM β-mercaptoetanol
  - 2% SDS

## 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almolöf, T., Wright, A., & Gustafsson, J. (1995). Role of Acidic and Phosphorylate Residues in Gene Activation by the Guccorticoid Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17535–17540

2. Beato, M., & Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, 6(3), 225–236.
3. Beck, I. M. E., Berghe, W. Vanden, Vermeulen, L., Yamamoto, K. R., Haegeman, G., & De Bosscher, K. (2009). Crosstalk in inflammation: The interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocrine Reviews*, 30(7), 830–882.
4. Biddie, S. C., Conway-campbell, B. L., & Lightman, S. L. (2012). Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology*, 51(3), 403–412.
5. Blind, R. D., & Garabedian, M. J. (2008). Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(1), 150-157.
6. Bodwell, J. E., Orti, E., Coull, J. M., Pappin, D. J. C., Smith, L. I., & Swift, F. (1991). Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(12), 7549–7555.
7. Chen, W., Dang, T., Blind, R. D., Wang, Z., Cavasotto, C. N., Hittelman, A. B., ... & Garabedian, M. J. (2008). Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Molecular Endocrinology*, 22(8), 1754-1766.
8. Cote-Vélez, A., Pérez-Martínez, L., Díaz-Gallardo, M. Y., Pérez-Monter, C., Carreón-Rodríguez, A., Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (2005). Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: Identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(1), 177–197.
9. Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2), 239–252.
10. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., & Haegeman, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B or activator protein-1: Molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine Reviews*, 24(4), 488–522.

11. De Martino, M. U., Bhattacharyya, N., Alesci, S., Ichijo, T., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2004). The Glucocorticoid Receptor and the Orphan Nuclear Receptor Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II Interact with and Mutually Affect Each Other's Transcriptional Activities: Implications for Intermediary Metabolism. *Molecular Endocrinology*, 18(4), 820–833.
12. Diaz-Gallardo, M., Cote-Vélez, Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (2010). A Rapid Interference between Glucocorticoids and cAMP-Activated Signalling in Hypothalamic Neurons Prevents Binding of Phosphorylated cAMP Response Element Binding Protein and Glucocorticoid Receptor at the CRE-Like and Composite GRE Sites of Thyrotropin. *Journal of Neuroendocrinology*, 22, 282–293.
13. Diefenbacher, M. E., Litfin, M., Herrlich, P., & Kassel, O. (2010). The nuclear isoform of the LIM domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at the promoter-bound glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
14. Dostert, A., & Heinzl, T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Current pharmaceutical design*, 10(23), 2807.
15. Fekete, C., & Lechan, R. M. (2013). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine reviews*, 35(2), 159-194.
16. Galliher-Beckley, A. J., & Cidlowski, J. A. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life*, 61(10), 979–986.
17. Gomez-Sanchez, E., & Gomez-Sanchez, C. E. (2015). The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor. *Compr Physiol*, 4(3), 965–994.
18. Haske, T., Nakao, M., & Moudgil, V. K. (1994). Phosphorylation of immunopurified rat liver glucocorticoid receptor by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Molecular and cellular biochemistry*, 132(2), 163-171.
19. Herman, J. P., Mcklveen, J. M., Solomon, M. B., Carvalho-Netto, E., &

- Myers, B. (2012). Neural regulation of the stress response: Glucocorticoid feedback mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(4), 292–298.
20. Hu-Jm, Bodwell-Je, & Munck, A. (1994). Cell cycle-dependent glucocorticoid receptor phosphorylation and activity. *Mol Endocrinol*, 8(12), 1709–1713.
21. Iñiguez-Iluhí, J. a, Lou, D. Y., Yamamoto, K. R., & In, J. a. (1997). Molecular Genetics: Three Amino Acid Substitutions Selectively Disrupt the Activation but Not the Repression Function of the Glucocorticoid Receptor N Terminus Three Amino Acid Substitutions Selectively Disrupt the Activation but Not the Repression Funct. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4149–4156.
22. Ismaili, N., & Garabedian, M. J. (2004). Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, 86–101.
23. Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H., & Imai, K. (2002). Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Molecular endocrinology*, 16(10), 2382-2392.
24. Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., & Charli, J.-L. (2015a). Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *Journal of Endocrinology*, 224(3), R139–R159.
25. Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., Uribe, R. M., & Charli, J. L. (2015b). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary–thyroid axis. *Journal of Endocrinology*, 226(2), T85-T100.
26. Karin, M., & Gallagher, E. (2005). From JNK to pay dirt: Jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*, 57(4–5), 283–295.
27. Kassel, O., & Herrlich, P. (2007). Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: Molecular aspects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 13–29.

28. Kassel, O., Schneider, S., Heilbock, C., Litfin, M., Göttlicher, M., & Herrlich, P. (2004). A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF- $\kappa$ B-regulated promoters. *Genes and Development*, *18*(20), 2518–2528.
29. Ki, S. H., Cho, I. J., Choi, D. W., & Kim, S. G. (2005). Glucocorticoid Receptor (GR)-Associated SMRT Binding to C / EBP $\beta$  TAD and Nrf2 Neh4 / 5: Role of SMRT Recruited to GR in GSTA2 Gene Repression. *Society*, *25*(10), 4150–4165.
30. Krstic, M. D., Rogatsky, I., Yamamoto, K. R., & Garabedian, M. J. (1997). Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(7), 3947–54. Retrieved from
31. Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological Reviews*, *89*(2), 535–606.
32. Langlais, D., Couture, C., Balsalobre, A., & Drouin, J. (2012). The Stat3/GR Interaction Code: Predictive Value of Direct/Indirect DNA Recruitment for Transcription Outcome. *Molecular Cell*, *47*(1), 38–49.
33. Lewis-Tuffin, L. J., & Cidlowski, J. A. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor  $\beta$  (hGR $\beta$ ) and glucocorticoid resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1069*, 1–9.
34. Liu, J., & DeFranco, D. B. (2000). Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Molecular Endocrinology*, *14*(1), 40-51.
35. Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends in Cell Biology*, *16*(6), 301–307.
36. MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *61*(2), 171–177.
37. Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and

- trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
38. Marcin Boruk, J. G. A. S. and R. J. G. H. (1998). AF-2-Dependent Potentiation of CCAAT Enhancer Binding Protein $\beta$  -Mediated Transcriptional Activation by Glucocorticoid Receptor, (November), 1–15.
  39. Miksicek, R., & Borgmeyer, U. (1987). Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequences is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus. *The EMBO Journal* vol.6, 6(5), 1355–1360.
  40. Morishima, Y., Murphy, P. J. M., Li, D. P., Sanchez, E. R., & Pratt, W. B. (2000). Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18054–18060.
  41. Myers, B., Mcklveen, J. M., & Herman, J. P. (2014). Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(2), 180–196.
  42. Nillni, E. (2010). Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs, *Front. Neuroendocrinol.* 31, 134–156
  43. Oakley, R. H., Jewell, C. M., Yudt, M. R., Bofetiado, D. M., & Cidlowski, J. A. (1999). The Dominant Negative Activity of the Human Glucocorticoid Receptor B Isoform. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27857–27866.
  44. Pocuca, N., Ruzdijic, S., Demonacos, C., Kanazir, D., & Krstic-Demonacos, M. (1998). Using yeast to study glucocorticoid receptor phosphorylation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.
  45. Popovic, N., Ruzdijic, S., Kanazir, D. T., Niciforovic, A., Adzic, M., Paraskevopoulou, E., Pantelidou, C., Radojic, M., Demonacos, C., Krstic-Demonacos, M. (2010). Site-specific and dose-dependent effects of glucocorticoid receptor phosphorylation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Steroids*, 75(6), 457–465.

46. Rangarajan, P. N., Umesono, K., & Evans, R. M. (1992). Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase A. *Molecular endocrinology*, 6(9), 1451-1457.
47. Ratman, D., Vanden Berghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I. M., & De Bosscher, K. (2013). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 380(1–2), 41–54.
48. Revollo, J. R., & Cidlowski, J. A. (2009). Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1179, 167–178.
49. Rogatsky, I., Logan, S. K., & Garabedian, M. J. (1998). Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2050–5.
50. Rogatsky, I., Waase, C. L. M., & Garabedian, M. J. (1998). Phosphorylation and Inhibition of Rat Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activation by Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3). *The Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14315–14321.
51. Sacta, M. A., Chinenov, Y., & Rogatsky, I. (2016). Glucocorticoid signaling: An update from a genomic perspective. *Annual Review of Physiology*, 78, 155–180.
52. Sakai, D. D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J. A., Rottman, F. M., & Yamamoto, K. R. (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes & Development*, 2(9), 1144–1154.
53. Savory, J. G., Hsu, B., Laquian, I. R., Giffin, W., Reich, T., Haché, R. J., & Lefebvre, Y. a. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), 1025–1037.
54. Schena, M., Freedman, L. P., & Yamamoto, K. R. (1989). Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities. *Genes & Development*, 3(10), 1590–1601.

55. Schmid, W., Cole, T. J., Blendy, J. A., & Schütz, G. (1995). Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53(1–6), 33–35.
56. Schwartz, G. J., & Zeltser, L. M. (2013). Functional Organization of Neuronal and Humoral Signals Regulating Feeding Behavior Gary. *Annu Rev Nutr*, 33, 1–21.
57. Sotelo Rivera, I. (2012). Estudio del mecanismo molecular de la interferencia entre el receptor de glucocorticoides y la señal de AMPc en el gen pro-TRH. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
58. Sotelo-Rivera, I., Cote-Vélez, A., Uribe, R.-M., Charli, J.-L., & Joseph-Bravo, P. (2017). Glucocorticoids curtail stimuli-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A. *Endocrine*, 55(3), 861–871.
59. Sotelo-Rivera, I., Jaimes-Hoy, L., Cote-Velez, A., Espinoza-Ayala, C., Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (2014). An acute injection of corticosterone increases thyrotrophin-releasing hormone expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus but interferes with the rapid hypothalamus pituitary thyroid axis response to cold in male rats. *J Neuroendocrinol*, 26(12), 861–869.
60. Stoecklin, E., Wissler, M., Moriggl, R., & Groner, B. (1997). Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 17(11), 6708–6716.
61. Strömstedt, P. E., Poellinger, L., Gustafsson, J. A., & Carlstedt-Duke, J. (1991). The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 11(6), 3379–3383.
62. Vandevyver, S., Dejager, L., & Libert, C. (2012). On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. *Traffic*, 13(3), 364–374.
63. Wallace AD, Cidlowski JA. 2001. Proteasome-mediated glucocorticoid

receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 276:42714–21.

64. Wallberg, A. E., Neely, K. E., Gustafsson, J. A., Workman, J. L., Wright, A. P., & Grant, P. A. (1999). Histone acetyltransferase complexes can mediate transcriptional activation by the major glucocorticoid receptor activation domain. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), 5952–9. Retrieved from
65. Wang, Z., Frederick, J., & Garabedian, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26573–26580.
66. Wang, Z., & Garabedian, M. J. (2003). Modulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation, phosphorylation, and growth inhibition by p27Kip1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50897-50901.
67. Whitfield, G. K., Jurutka, P. W., Haussler, C. a, & Haussler, M. R. (1999). Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *Journal of Cellular Biochemistry, Suppl 32-3* (September), 110–22.
68. Wilder, R. L., Cupps, T. R., Balow, J. E., Endocrinol-, P., Branch, D. E., Develop-, H., & Receptors, G. (1993). Glucocorticoid Therapy for Immune-mediated Diseases: Basic and Clinical Correlates, 119(12), 1198–1208.
69. Yang, S.-H., Sharrocks, A. D., & Whitmarsh, A. J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*, 320, 3–21.