



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Caracterización del papel de las inmunofilinas en la regulación de factores de transcripción

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Química Biológica

Autora: Lic. María Fernanda Camisay

Directora de tesis: Dra. Alejandra G. Erlejman

Consejera de estudios: Dra. Cecilia L. Varone

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Celular y Molecular (QB68)/
Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA.

Fecha de la defensa: 11-3-2019

Buenos Aires, 2018

RESUMEN

Caracterización del papel de las inmunofilinas en la regulación de factores de transcripción

Las inmunofilinas son una familia de proteínas que presentan un dominio con actividad peptidil-prolil-isomerasa (PPlasa); la mayoría de las cuales unen drogas inmunosupresoras. Dentro esta familia, se encuentran las FKBP (FK506 Binding Proteins) que unen al macrólido FK506. Nuestro laboratorio demostró que FKBP-51 kDa (FKBP51) y FKBP-52 kDa (FKBP52) regulan antagónicamente la actividad transcripcional y localización subcelular de ciertos factores nucleares (NF-kappaB y receptores esteroides). El objetivo de esta tesis fue estudiar la regulación de las FKBP sobre el complejo de factores de transcripción AP-1, particularmente sobre c-Fos y c-Jun, en células trofoblásticas (BeWo). Demostramos que FKBP52 favorece la activación sostenida de la quinasa ERK e incrementa la estabilidad proteica, la retención nuclear, la actividad transcripcional, la unión al ADN y los niveles de proteína de los miembros de AP-1. Por el contrario, la sobreexpresión de FKBP51 retrasa y disminuye la importación nuclear de c-Fos, como también inhibe la actividad transcripcional de AP-1. La contribución funcional del dominio PPlasa de ambas FKBP resultó relevante en la modulación de AP-1. A nivel de los efectos biológicos de genes involucrados en placentación, y blancos de regulación de AP-1 y NF-kappaB, encontramos que FKBP52 aumenta los niveles de proteína de las metaloproteasas de la matriz (MMP-2 y MMP-9) e interleuquina 6 (IL-6). Asimismo, FKBP52 modula positivamente la actividad proteolítica de MMP-2. Mientras que FKBP51 reduce los niveles de proteína y la actividad gelatinasa de MMP-2. Finalmente, observamos que la Epigallocatequina Galato (EGCG, flavonoide presente en el té verde) actúa inhibiendo el efecto positivo de FKBP52 sobre la actividad de AP-1 y NF-kappaB .

Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que FKBP51 y FKBP52 regulan a los factores de transcripción de la familia AP-1. Esta regulación sería dependiente de la actividad PPlasa de estas FKBP y ocurriría en forma antagónica . Más aún, postulamos que FKBP52 es un potencial blanco farmacológico de EGCG.

Palabras claves: *FKBP51, FKBP52, AP-1, C-FOS, C-JUN, EGCG, NF-KAPPAB, PLACENTA, CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS*

ABSTRACT

Characterization of immunophilins regulation on transcription factors

Inmunophilins are a family of proteins with a peptidyl-prolyl isomerase domain (PPIase), many of them bind immunosuppressant drugs. Among the members of this family, FKBP5 (FK506 Binding Proteins) bind the macrolide FK506. Our laboratory showed that both FKBP-51 kDa (FKBP51) and FKBP-52 kDa (FKBP52) regulate NF- κ B and steroid receptors transcriptional activity and subcellular localization in an antagonistic manner. The aim of this thesis was to study FKBP5 regulation on AP-1, particularly c-Fos and c-Jun, in BeWo trophoblastic cells. We demonstrated that FKBP52 favours a sustained ERK activation and increases the protein stability, the nuclear retention, the transcriptional activity, the DNA binding and protein levels of AP-1 members. In other matters, FKBP51 overexpression delays and reduces c-Fos nuclear entry as well as it inhibits AP-1 transcriptional activity. PPIase activity of both FKBP5 consists on an important part of AP-1 modulation. In regards to the biological effects of AP-1 and NF- κ B target genes which are also involved in placentation, we found that FKBP52 not only increases matrix metalloproteases (MMP-2 and MMP-9) and interleukin 6 (IL-6) protein levels but also MMP-2 proteolytic activity. Whereas, FKBP51 decreases MMP-2 protein level and gelatin-degrading activity. Finally, we observed that Epigallocatechin Gallate (EGCG, green tea flavonoid) modulates negatively AP-1 and NF- κ B transcriptional activity mediated by FKBP52. The results of this Doctoral Thesis encourage that FKBP51 and FKBP52 regulate AP-1, mainly in an opposite and PPIase dependent manner. We speculate that FKBP52 is a potential and pharmacology EGCG target.

Keywords: *FKBP51, FKBP52, AP-1, C-FOS, C-JUN, NF-KAPPAB, PLACENTA, EGCG, TROPHOBLASTIC CELLS*

AGRADECIMIENTOS

La vida es un constante empezar y terminar. Maravilloso e intrigante, por cierto. Todo el tiempo estamos creciendo, madurando, cerrando y abriendo ciclos en nuestras vidas.

Hoy me encuentro transitando los últimos pasos de un proyecto, un sueño de pequeña que me acompañó durante varios años. Me resulta curioso recordar a aquella joven quien, sin más herramientas que una licenciatura recién estrenada y un apetito tremendo de mesada, se le dio la oportunidad de entrar a un laboratorio. Fue un largo trayecto, una experiencia única e inolvidable. Si bien, hubo un montón de obstáculos en el camino, crecí con ellos. Aprendí a levantarme y a abrir los ojos frente a cada oportunidad. Sin duda, el destino hizo una de las suyas. Pensé en formarme profesionalmente pero la realidad es que también crecí personalmente. En el contexto de este trabajo, desearía agradecer públicamente a algunas de las muchas personas que contribuyeron activamente a lo largo de mi doctorado. Me reservo unos cuantos saludos de todo corazón a mis afectos más cercanos.

En primer lugar, agradezco a todos los integrantes del laboratorio por el día a día y el apoyo tanto en lo laboral como personal. Gracias a todos por permitirme ser una más del equipo. A Ale, por ser mi directora, por la confianza en mi trabajo y por todas las oportunidades que me diste. A Mario por darme el aval para realizar la tesis doctoral en el labo. Y a Ana, que además de aquellas charlas que quedarán eternamente en mi memoria, me diste una mano gigante con el acoplamiento molecular de FKBP52 y EGCG.

En segundo lugar, agradezco al Departamento de Química Biológica y a toda la gente hermosa que forma parte de esta comunidad científica, por abrirme las puertas, por alentarme constantemente y ayudarme en la búsqueda de soluciones a mis problemas.

Y por último, y no menos importante, a Dios por ser mi soporte y la luz de mi vida. ¡Gracias!

TRABAJOS PUBLICADOS

1. Mazaira GI, **Camisay MF**, De Leo SA, Erlejman AG, Galigniana MD. Biological relevance of Hsp90-binding immunophilins in cancer development and treatment. **INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER**. 138:797-808 (2016) PMID: 25754838. FI: 6,77. Q1.
2. Lagadari M, De Leo SA, **Camisay MF**, Galigniana MD, Erlejman AG. Regulation of NF-kappaB signalling cascade by immunophilins. *Current Molecular Pharmacology*. 9(2):99-108.(2016).PMID: 25986566. FI:2,39.Q2
3. Erlejman AG, De Leo S, Mazaira GI, Molinari AM, **Camisay MF**, Cox M, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD. NF- κ B Transcriptional Activity is Modulated by FK506-binding Proteins FKBP51 and FKBP52: A Role for Peptidyl-prolyl Isomerase Activity. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, 289: 26263-76 (2014). PMID: 25104352. FI: 4,96. Q1.
4. Trabajo en preparación. **Camisay MF**, De Leo S, Mazaira GI, Garcia G, Galigniana MD, Erlejman AG. Novel regulator on transcription factor AP-1 pathway. Characterization of FKBP52 action on human trophoblast cells. Placenta
5. Trabajo en preparación. **Camisay MF**, De Leo SA, Cauerff A, Mazaira GI, Galigniana MD, Erlejman AG. FKBP52 protein as a new target for polyphenols-mediated NF- κ B and AP-1 inhibition. *Free Radical Biology and Medicine*.

ABREVIATURAS

ACTH (*Adrenocorticotropic hormone*): Hormona adrenocorticotropina
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
AKT: Proteína quinasa B
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
AP-1 (*Activating protein 1*): Proteína activadora 1
AR (*Androgen receptor*): Receptor de andrógenos
ARN: Ácido Ribonucleico
ARNasa: Ribonucleasa
ARNm: ARN mensajero
ATF (*Activating transcription factor*): Factor de transcripción activador
Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*): Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B
Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*): Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B extra grande
BSA (*Bovine serum albumin*): Albúmina de suero bovino
B-Zip (*Basic Leucine Zipper Domain*): Región básica de unión al ADN y un motivo hidrofóbico responsable de la dimerización de AP-1
C: Catequina
CaM quinasa: Calcio/Calmodulina proteína quinasa
CK2 (*Casein kinase 2*): Caseína quinasa 2
Co-IP: Co-inmunoprecipitación.
CRD (*Coding Region Determinant*): Región codificante determinante
CRE (*cAMP-responsive Element*): Elemento de respuesta al AMPc
CREB (*cAMP response element-binding*): proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc
CRH (*Corticotropin-releasing hormone*): Hormona liberadora de corticotropina
CsA (*Ciclosporine A*): Ciclosporina A
CyPs (*Ciclophilins*): Ciclofilinas
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*): Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DO: Densidad óptica
DTT: Ditiotreitól
EC: Epicatequina
ECG: Epicatequina Galato
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EGCG: Epigallocatequina galato
EGF (*Epidermal growth factor*): Factor de crecimiento epidérmico

EGTA: Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*): Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ELK1 (*ETS domain-containing protein 1*): Proteína con dominio ets

EMSA(*Electrophoretic mobility shift assay*): Ensayo de cambio movilidad electroforética

ER (*Estrogen receptor*): Receptor de estrógeno

ERK (*Extracellular signal–regulated kinase*): Quinasa regulada por señales extracelulares

EROs: Especies reactivas del oxígeno

FA: Fosfatasa alcalina

FAM (*Fos activating domains*): dominios de activación de de c-Fos

FKBPs (*FK506 Binding Proteins*): Proteínas de unión a FK506

FKBP12: Proteína de unión a FK506 de 12 KDa

FKBP51: Proteína de unión a FK506 de 51 KDa

FKBP52: Proteína de unión a FK506 de 52 KDa

FRK (*Fos-regulating kinase*): Quinasas reguladoras de Fos

FT: Factor de transcripción

FTDP (*Frontotemporal dementia with parkinsonism*): Demencia fronto-temporal y Parkinsonismo asociado al cromosoma 17

G418: Geneticina

GFP (*Green fluorescent protein*): proteína fluorescente verde

GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*): Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GR (*Glucocorticoid receptor*): Receptor de glucocorticoides

GREs (*GR Response Elements*): Elementos de respuesta al receptor de glucocorticoides

GST (*Glutathione S-transferase*): Glutatiión S-transferasa

H: Horas

HEPES: N-2-hidroxietilopiperacina-N-2-etano ácido sulfónico

HIF (*Hypoxia-inducible factor*): Factor inducible por hipoxia

HLA-G (*Human leukocyte antigen-G*): Antígeno G humano leucocitario

HPA (*Hypothalamic pituitary adrenal*): Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

HOB (*Homology box*): Secuencias homólogas de c-Fos.

HRP (*Horseradish peroxidase*): Peroxidasa de rábano

Hsp (*Heat shock protein*): proteína de choque térmico

Hsp70: Proteína de choque térmico de 70 KDa

Hsp90: Proteína de choque térmico de 90 KDa

I: Inmune

ID1(*Inhibitor domain 1*): dominio inhibidor de c-Fos

IEG (*Immediate early gene*): Gen de respuesta temprana

IkappaB (*Inhibitory pe Kappa B*): Proteína inhibitoria de NF-KappaB

IKK (*IkappaB kinase*): Proteína quinasa IkappaB

IgG: Inmunoglobulina de tipo G

IFI (*Indirect immunofluorescence*): Inmunofluorescencia indirecta
INF γ : Interferón- γ
INPUT: Contenido total de proteínas en el lisado celular sin inmunoprecipitar
IL-1: Interleuquina 1
IL-6: Interleuquina 6
IL-8: Interleuquina 8
INMs (*Inmunophilins*): Inmunofilinas
IPTG: Isopropil- β -D-tio-galactósido
JNK (*c-Jun N-terminal kinase*): Quinasa N-terminal de c-Jun
kDa: Kilodalton
KO (*Knock out*)
LB: Luria-Bertani
Luc: Enzima Luciferasa
MAF: protooncogén proveniente del Fibrosarcoma aviar Músculo-Aponeurótico
MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*): Quinasa activada por mitógenos
MEC: Matriz extracelular
min: Minutos
MMPs (*Matrix metalloproteinases*): Metaloproteasas de la matriz
MMP-2: Metaloproteasa de la matriz 2
MMP-9: Metaloproteasa de la matriz 9
MR (*Mineralocorticoid receptor*): Receptor de mineralocorticoides
MT-MMPs (*Membrane-type MMPs*): Metaloproteasas de la matriz asociadas a la membrana
MTOR (*Mammalian target of rapamycin*): Quinasa sensible a la rapamicina
MTT: Metil tiazol tetrazolio
NAC: N-acetilcisteína
NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*): Factor nuclear de linfocitos T activados
NF-kappaB (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*): Factor nuclear kappa B
Neo: Neomicina
NI: No inmune
NIH (*National Institutes of Health*): Instituto Nacional de la salud
NPC (*Nuclear pore complex*): Complejo del poro nuclear
NT: No transfectado
Nup62 (*Nucleoporin p62*): Nucleoporina 62
ONPG: Orto-nitrofenilgalactopiranosido
P4 (*Progesterone*): Progesterona
PBD (*Protein Data Bank*): Base de datos de proteínas
PBS: Tampón fosfato salino
PDGF (*Platelet-derived growth factor*): Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PEI: Polietilenimina
PEST: dominios desestabilizadores de la proteína c-Fos
PFA: Paraformaldehido
PHLPP (*Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase*): Fosfatasa de proteína repetida del dominio PH rico en leucina
PKC (*Protein kinase C*): Proteína quinasa C
PI3K (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*): fosfoinositol 3-quinasa
PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato
Poly-dIdC: sal sódica del ácido poli (deoxiinosinico-deoxicitidilico)
PPI (*Protein phosphatase 1*): proteína fosfatasa 1
PP2A (*Protein phosphatase 2A*): proteína fosfatasa 2A
PP5 (*Protein phosphatase 5*): Proteína fosfatasa 5
PPlasa: Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
PR (*Progesterone receptor*): Receptor de progesterona
PRDX6 (*Peroxiredoxin-6*): peroxiredoxina-6
S: Segundos
SDS (*Sodium dodecyl sulfate*): Duodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*)
SIE (*c-sis-inducible element*): Elemento inducible por c-Sis
SFB: Suero fetal bovino
SOB: Cultivo super óptimo
SOC: Cultivo superóptimo con glucosa
SRE (*Serum response element*): Elemento de respuesta a suero
STATs: proteínas transductores y activadores de las señales de transcripción
RE: Receptor de esteroides
RSK (*Ribosomal s6 kinase*): Quinasas ribosomales S6
TA: Temperatura ambiente
TAD (*Transactivation domain*): Dominio de transactivación
TBOOH: Terbutil-hidroperóxido
TBS: Tampón Tris salino
TCF (*Ternary complex factor*): Complejo ternario de factores
TDT: Desoxinucleotidil transferasa terminal
TFII (*Transcription factor II*): Factor de transcripción II
TIMPs (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*): Inhibidores tisulares de metaloproteasas de la matriz
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α
TPA: Acetato de tetradecanoilforbol
TPR (*Tetratricopeptide repeats*): Repeticiones de tetratricopéptido
URL: Unidades arbitrarias de luciferasa
UTR (*Untranslated region*): Región no traducible
UV: Radiación ultravioleta
V: Voltaje
WB (*Western Blot*): Electrotransferencia e inmuno detección de proteínas

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
TRABAJOS PUBLICADOS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
INDICE.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
1. Inmunofilinas.....	12
1.1. Definición y clasificación de las inmunofilinas.....	12
1.2. Actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa de las inmunofilinas.....	13
1.3. <i>FK506 Binding Proteins</i> : FKBP de 51 kDa (FKBP51) y FKBP de 52 kDa (FKBP52).....	17
2. Factores de transcripción: NF-kappaB y AP-1.....	26
2.1. Factor nuclear kappa B (NF-KappaB).....	26
2.2. Proteína activadora (AP-1).....	28
3. AP-1 y NF-kappaB en placenta.....	40
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	46
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1. Materiales usados en la Tesis Doctoral.....	50
1.1. Bacterias.....	50
1.2. Cultivos celulares.....	50
1.3. Reactivos utilizados.....	55
2. Manipulación de ADN.....	58
2.1. Plásmidos.....	58
2.2. Preparación de bacterias competentes.....	60
2.3. Transformación de bacterias competentes.....	61
2.4. Purificación de ADN plasmídico.....	61
2.5. Cuantificación de ADN plasmídico.....	62
2.6. Electroforesis en gel de agarosa.....	63
3. Ensayos de transactivación.....	63
3.1. Determinación de la actividad luciferasa y β -galactosidasa.....	64
4. Análisis traduccional.....	65
4.1. Preparación de extractos celulares.....	65
4.2. Cuantificación de proteínas.....	66
4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	67
4.4. Electrotransferencia de proteínas (<i>Western blot</i>) e Inmunodetección de proteínas.....	68
4.6. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	70
4.7. Co-Inmunoprecipitación.....	71
4.8. Fraccionamiento subcelular.....	72

4.9. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).....	73
4.10. Ensayos de zimografía.....	74
4.11. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	75
4.12. Purificación de FKBP52-GST.....	76
5. Evaluación de viabilidad celular.....	77
6. Evaluación del crecimiento celular a largo plazo: Ensayo de colonias.....	78
7. Análisis bioinformático del acoplamiento molecular de FKBP52 - ligando....	78
8. Análisis de datos y procesamiento estadístico.....	79
RESULTADOS.....	80
1. Mecanismo de acción regulatoria de las FKBP5s sobre AP-1.....	81
1.1. Estudio de la fosforilación de las quinasas ERK y JNK mediado por las FKBP5s.....	81
1.2. Modulación de los niveles proteicos de c-Fos.....	87
1.3. Regulación de la fosforilación de c-Fos.....	92
1.4. Efectos de las FKBP5s sobre la estabilidad de c-Fos y c-Jun.....	93
1.5. Efectos de las FKBP5s sobre la distribución subcelular de c-Fos.....	100
1.6. Efectos de las FKBP5s sobre la actividad transcripcional de AP-1.....	108
1.7. C-Fos interacciona con las FKBP5s.....	120
1.8. Efectos de FKBP52 sobre la unión de AP-1 a sus sitios blancos de ADN122	
2. Efectos biológicos de la regulación de las FKBP5s sobre AP-1 y NF- kappaB....	126
2.1. Estudio de las funciones biológicas de AP-1 reguladas por FKBP5s en células BeWo.....	126
2.2. Efectos de FKBP5s sobre MMPS e IL-6.....	127
2.3. Efectos de FKBP51 sobre el número de células.....	138
2.4. Caracterización de clones estables de FKBP51.....	140
3. Efectos funcionales de EGCG sobre la acción regulatoria de FKBP52 descrita para los factores de transcripción AP-1 y NF-kappaB.....	145
3.1. Efectos de los flavonoides sobre la actividad transcripcional de AP-1 y NF-kappaB mediada por FKBP52.....	145
3.2. Efectos de los flavonoides sobre la viabilidad celular.....	153
3.3. Efectos de EGCG sobre las funciones biológicas de AP-1 y NF-kappaB157	
3.4 Estudio de la unión in silico de FKBP52 y EGCG.....	159
DISCUSIÓN.....	162
1. Discusión del capítulo 1.....	163
2. Discusión del capítulo 2.....	170
3. Discusión capítulo 3.....	174
4. Discusión general.....	178
BIBLIOGRAFÍA.....	184

INTRODUCCIÓN

1. Inmunofilinas

1.1. Definición y clasificación de las inmunofilinas

Se denominan inmunofilinas (INMs) a un grupo de proteínas endógenas que presentan un dominio con actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa); la mayoría de las cuales unen drogas inmunosupresoras (Galat, 1993) (Figura 1). En función del ligando inmunosupresor que unan, las INMs se clasifican en diferentes subfamilias: aquellas INMs que unen al undecapéptido cíclico ciclosporina A (CsA), se denominan ciclofilinas (CyPs, según sus siglas en inglés *cyclophilines*). Mientras que las que tienen la facultad de unirse al mácrolido cíclico tacrolimus (FK506) reciben el nombre de proteínas de unión a FK506 (FKBPs, según sus siglas en inglés *FK506 Binding Proteins*). Muchos miembros de la subfamilia de FKBPs pueden unirse también a la droga sirolimus (o rapamicina). Existe una tercera subfamilia de INMs conocidas como las parvulinas. Las parvulinas muestran cierta homología con el dominio PPIasa del resto de las INMs, pero no son capaces de unir drogas inmunosupresoras.

Las INMs de bajo peso molecular como ciclofilina A y FKBP12 (12-kDa) al unirse a la droga inmunosupresora participan en procesos de inmunosupresión, no así las parvulinas. Los complejos de ciclofilina A•CsA y FKBP12•FK506 favorecen la inhibición de la subunidad catalítica de la calcineurina (o fosfatasa PP2B dependiente de calcio/calmodulina), y en consecuencia, bloquean la activación de la vía del factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT). La activación de NFAT es un requisito necesario para la producción de interferón- γ (INF γ) e interleuquinas (Rao, 1997). De forma similar, el complejo FKBP12•rapamicina inhibe a la quinasa mTOR, y por consiguiente, interfiere con la señalización de linfocitos T activada por citoquinas (Sabers, 1995).

En el caso de las INMs de alto peso molecular, su función biológica no ha sido del todo dilucidada y aún continúa siendo materia de estudio. Como ocurre con la

mayoría de los miembros de la familia, estas INMs unen a las drogas inmunosupresoras, que inhiben su actividad PPIasa, pero no desencadenan procesos de inmunosupresión. Varias de estas INMs son chaperonas y se encuentran asociadas a los receptores de esteroides (RE) u otros factores de transcripción (FTs).

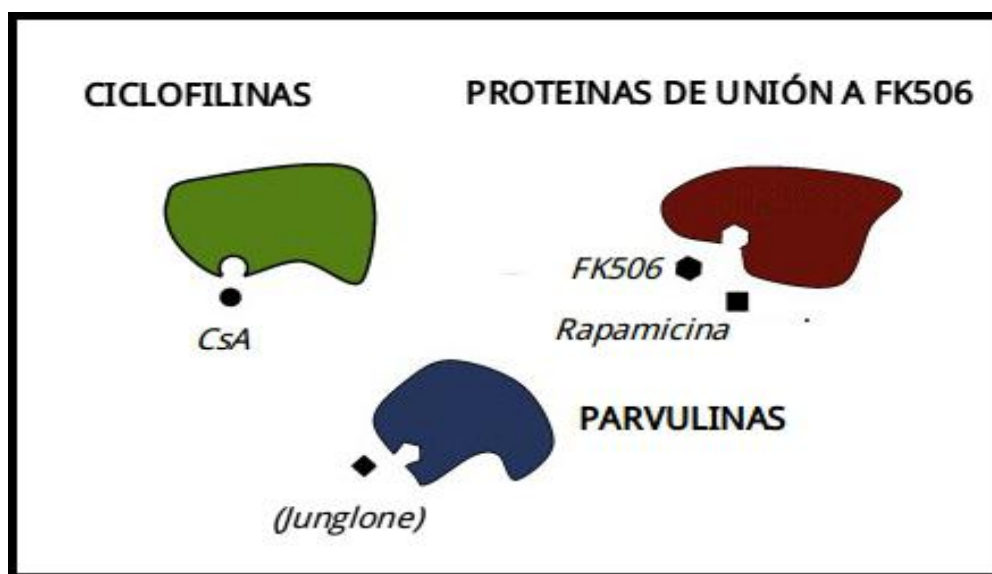


Figura 1. Subfamilias de Inmunofilinas y sus respectivos inhibidores

CsA, FK506 y rapamicina son comúnmente usados como agentes inmunosupresores. El compuesto junglone se muestra entre paréntesis para indicar que se trata de un inhibidor no específico de las parvulinas. Figura adaptada de Hanes, 2013.

1.2. Actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa de las inmunofilinas

Descubiertas en 1984 por Fisher y colaboradores, las proteínas PPIasas se definen como enzimas que catalizan la isomerización cis-trans en uniones peptídicas que anteceden al aminoácido prolina (X-Pro) (Figura 2).

Las uniones peptídicas presentan un carácter parcial de doble enlace que impide la libre rotación del enlace que une el átomo de carbono (C) del grupo carboxilo y el átomo de nitrógeno (N) del grupo amina. Esta rigidez del doble enlace limita las

posibilidades conformacionales de los péptidos. Existen dos configuraciones posibles:

- **Configuración *cis***: los dos átomos de C α se sitúan del mismo lado del doble enlace
- **Configuración *trans***: los dos átomos de C α se disponen a distinto lado del doble enlace.

Por lo general, la configuración *trans* está favorecida energéticamente en la mayoría de los grupos péptidos pues presenta menores restricciones estéricas que la conformación *cis*. Estos impedimentos estéricos se reducen en enlaces peptídicos que contienen residuos de prolina. Aproximadamente el 10 % de los residuos de prolina en las proteínas nativas van precedidos por un enlace peptídico en *cis*.

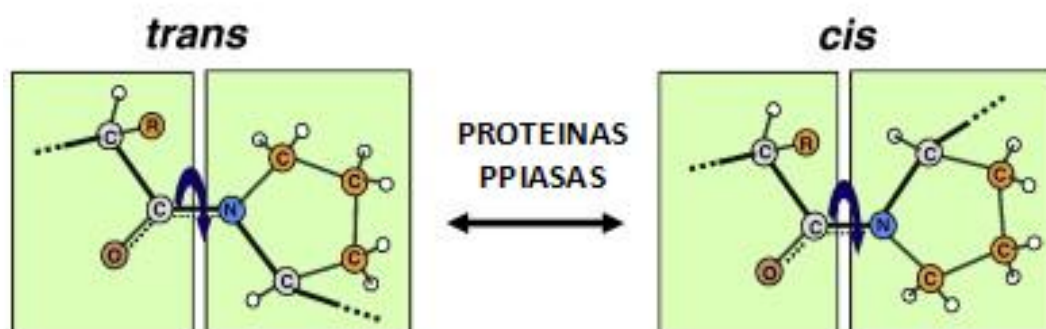


Figura 2. Interconversión *trans* \rightleftharpoons *cis* de una unión peptídica mediada por proteínas con actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa

Representación de las conformaciones *trans*/*cis* de una unión peptídica que precede al aminoácido prolina y su interconversión catalizada por proteínas PPIasas. Figura adaptada de Hanes, 2013.

La energía de activación requerida para la conversión de la conformación *cis* a *trans*, o viceversa, es elevada (cerca de 80 kJ/mol). En efecto, la isomerización espontánea de los enlaces peptídicos es una reacción lenta con constantes de tiempo que oscilan en el rango de 10-100 s a 25°C. Por acción de las enzimas

PPlasas, la isomerización de enlaces peptídicos puede acelerarse en un factor de 10^3 - 10^6 , de forma ATP independiente (Radzicka, 1996; Sanberg, 2008).

Las tres subfamilias de proteínas PPlasas (ciclofilinas, FKBP's y parvulinas), conservadas en todos los organismos vivos, presentan dominios catalíticos estructuralmente característicos y especificidad de sustrato (Figura 3). Sobre las bases de la especificidad del sustrato, las parvulinas tienen preferencia por enlaces peptídicos con motivos fosforilados, que precedan a una prolina (pSer-Pro o pThr-Pro) (Yaffre, 2008).

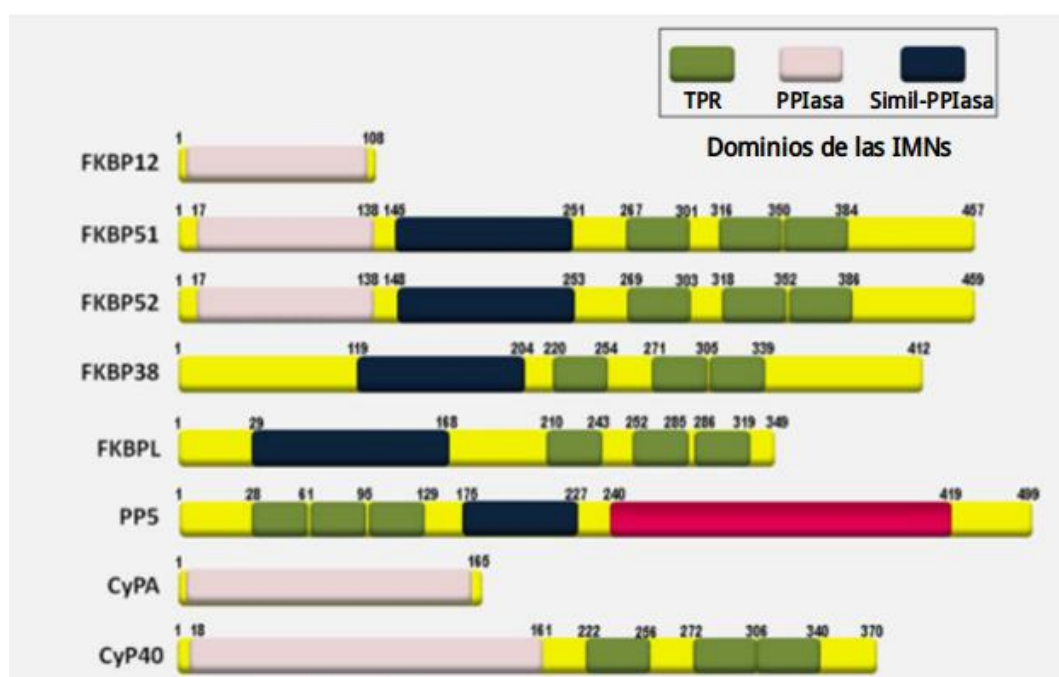


Figura 3. Dominios estructurales de inmunofilinas pertenecientes a las subfamilias de las proteínas de unión a FK506 (FKBP's) y ciclofilinas (CyP)

A diferencia de las INMs de alto peso molecular, FKBP12 y CyPA,, contienen el dominio PPIasa y son incapaces de interactuar con Hsp90, pues carecen de las repeticiones del dominio TPR. El dominio simil-PPIasa preserva la estructura del dominio PPIasa pero carece de actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa. Figura adaptada de Mazaira, 2016.

En células eucariotas, las proteínas PPlasas controlan la transcripción génica en múltiples niveles (Figura 4). La regulación puede empezar a nivel de la superficie celular mediante el clivaje de FTs asociados a la membrana. En el citoplasma, las proteínas PPlasas tienen la facultad de ejercer control sobre la estabilidad,

degradación y/o translocación nuclear de FTs. Asimismo, pueden funcionar como co-chaperonas formando complejos con RE, modulando la

unión del ligando y la importación nuclear. Ya en el núcleo, las proteínas PPlasas intervienen en la unión al ADN y la actividad transcripcional de FTs. Más aún, las enzimas PPlasas regulan la actividad de la ARN polimerasa II, mediante el reclutamiento de co-factores necesarios para el procesamiento co-transcripcional del ARN. Finalmente, estas isomerasas son capaces de alterar la estructura de la cromatina por medio de distintos mecanismos que incluyen a remodeladores de la cromatina y enzimas modificadoras de las histonas (Horowitz, 2002; Steger, 2002; Galigniana, 2010; Liou, 2011; Erlejman, 2014).

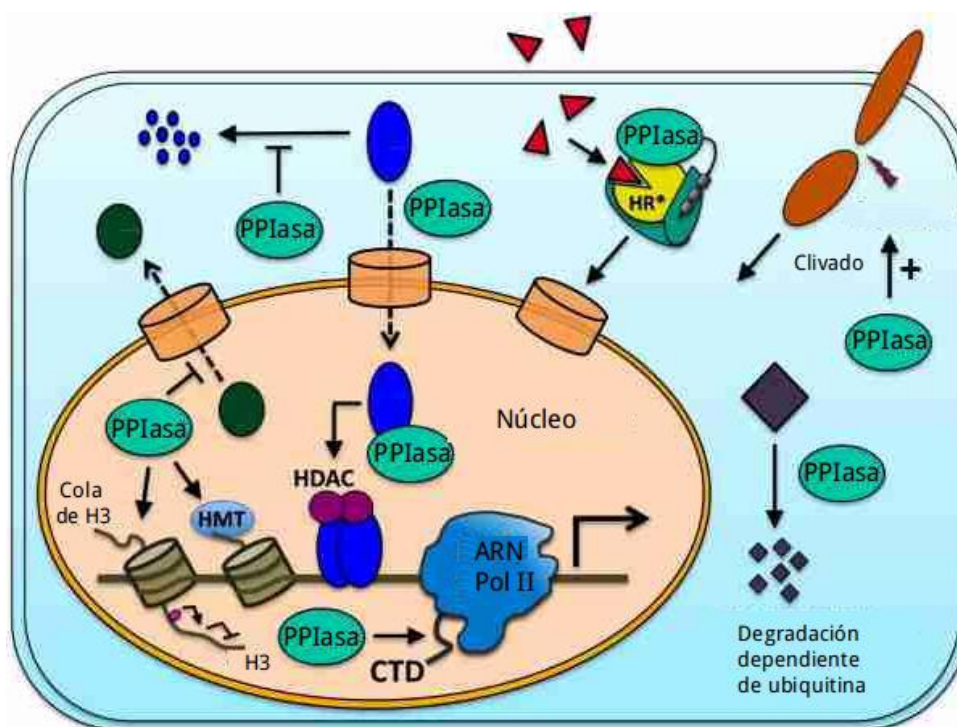


Figura 4. Resumen de las funciones de las proteínas con actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa en el control de la transcripción de células eucariotas

Los mecanismos de regulación de las proteínas PPlasas incluyen modulación de la estabilidad, importación nuclear y retención de los FTs, unión al ligando, activación de RE, reclutamiento de co-represores, modificación de las colas de las histonas e isomerización de la cola CTD de la ARN polimerasa. Figura adaptada de Hanes, 2014.

1.3. FK506 Binding Proteins: FKBP de 51 kDa (FKBP51) y FKBP de 52 kDa (FKBP52)

Han transcurrido más de 30 años desde que FKBP51 y FKBP52 fueron descubiertas como componentes del heterocomplejo de RE (Sanchez, 1990; Smith, 1990). Desde entonces, las funciones de ambas FKBP5 han sido ampliamente estudiada aportando nuevos conocimientos sobre la señalización de FTs, particularmente de RE (como el receptor de glucocorticoides -GR-, el de progesterona -PR- y el de andrógenos -AR-). También, se ha profundizado sobre la participación de las FKBP5 en patologías relacionadas al sistema endócrino, entre las cuales se incluye: el cáncer de mama, el cáncer de próstata, la reproducción, el estrés y las enfermedades metabólicas (Ward, 1999; Galigniana, 2001; Li, 2002; Binder, 2004; Cheung, 2005; Cao, 2011).

Si bien ambas FKBP5 presentan 60 % de homología y 75% de similitud en sus secuencias, usualmente muestran funciones antagónicas en los tejidos en donde se expresan. De forma tal que, si una INM estimula un proceso, la otra la inhibe. Por ejemplo, se ha observado que FKBP51 y FKBP52 compiten por la unión al complejo de RE; dada la sobreexpresión de FKBP51, disminuye la regulación del receptor mediada por FKBP52 (Mangelsdorf, 1995).

1.3.1. Estructuras de FKBP51 y FKBP52

Como se muestra la figura 5, FKBP51 y FKBP52 cuentan con tres dominios principales: dos dominios FK1 y FK2, que guardan similitud estructural con el dominio único de FBKP12, y un dominio de repeticiones de tetraticopéptidos (TPR, según sus siglas en inglés *tetraticopeptide repeats*) (Sinars, 2013).

El dominio FK1 cuenta con actividad PPlasa y es el sitio de unión de FK506. Tanto FKBP51 como FKBP52 presentan residuos críticos conservados para la

actividad PPIasa, y exhiben propiedades enzimáticas similares sobre péptidos pequeños (Pirkli, 2001). No obstante, ambas FKBP5s se comportan en forma antagónica al interactuar con sustratos peptídicos grandes. Se cree que esta divergencia funcional responde a diferencias de secuencia en el bucle rico de prolinas suspendido sobre el bolsillo catalítico de FK1. En efecto, se ha determinado que mutaciones de dos sitios puntuales del bucle rico de prolinas de FKBP51 (A116V and L119P) promueven una actividad enzimática similar de FKBP52 sobre el AR (Riggs, 2007). Más aún, quimeras del dominio PPIasa de ambas FKBP5s presentan roles biológicos entrecruzados (Wochnik, 2005).

Por su parte, el dominio FK2 continúa siendo enigmático. Si bien el dominio FK2 es estructuralmente parecido a FK1, carece de actividad PPIasa y no une FK506. Se ha reportado que la delección de tres aminoácidos del dominio FK2 de FKBP51 (D195, H196 y D197) no interrumpe la unión a la chaperona molecular Hsp de 90 kDa (Hsp90, por sus siglas en inglés *90 kDa heat shock protein*), pero si interfiere con el ensamblado del complejo de PR, sugiriendo una interacción entre FK2 y PR (Sinars, 2003).

Entre los dominios FK1 y FK2 de ambas FKBP5s se dispone una secuencia corta de unión de alrededor de 7 a 9 aminoácidos. En FKBP52, ese lazo de unión cuenta con una secuencia fosforilable por la caseína quinasa 2 (CK2), secuencia TEEED; dicho motivo se encuentra ausente en FKBP51. Asimismo, se ha reportado que la fosforilación del residuo T143 de la secuencia TEEED disminuye la unión a Hsp90 inhibiendo la regulación de FKBP52 sobre RE (Miyata, 1997). Sin embargo, este resultado no ha podido ser verificado in vitro, tras comparar la afinidad de unión entre Hsp90 y una mutante fosfomimética FKBP52-T143E, (Cox, 2007).

Finalmente, el dominio TPR está constituido por secuencias en tándem de 34 aminoácidos organizadas en α -hélices antiparalelas. Este dominio confiere a las FKBP5s la capacidad de interactuar con otras proteínas, entre las que se incluye Hsp90, mediante el motivo EEVD dispuesto en el extremo C-terminal de la chaperona molecular (Goebel, 1991).

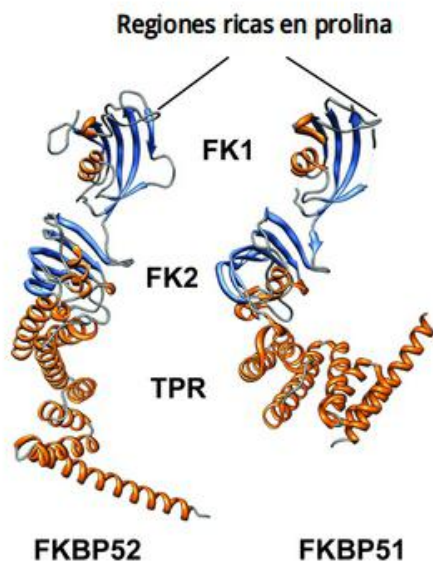


Figura 5. Estructuras cristalográficas de FKBP51 y FKBP52

La estructura tridimensional de FKBP51 humana (PDB: 1KT0) y la composición de 2 estructuras parciales de FKBP52 humana (PDB:1Q1C y PDB:1P5Q) se muestran en formato de hélices coloreadas. Los dominios FK1 y FK2 se colorean en azul con excepción de las regiones ricas en prolina que aparecen de color marrón. El extremo C-terminal, que contiene las repeticiones del dominio TPR, se representan en color marrón. Figura adaptada de Storer, 2003.

1.3.2. Funciones de FKBP51 y FKBP52

Se denominan chaperonas moleculares a aquellas proteínas cuya función es preservar las propiedades de sus proteínas clientes, mediante su correcto plegamiento. Las chaperonas acompañan a otras proteínas estabilizando las formas inestables, facilitando el ensamblado, la correcta unión de oligómeros, su transporte a otro compartimento celular o la disposición para su degradación. En este marco, se ha demostrado que FKBP52 posee actividad chaperona *in vitro*. Esta INM es capaz de interaccionar con proteínas mal plegadas y mantenerlas en un estado no agregado susceptible a replegarse (Bose, 1996; Pirkl, 2001). A nivel celular, aún se desconoce si la actividad de chaperona de FKBP52 constituye un mecanismo *per se* de sus acciones moduladoras.

Más aún, FKBP51 y FKBP52 actúan como co-chaperonas. Forman heterocomplejos con las chaperonas de choque térmico (Hsp90 y Hsp de 70 kDa - Hsp70, por sus siglas en inglés *70 kDa heat shock protein-*) y regulan en su conjunto, múltiples proteínas clientes: FTs (como RE, HIF1, p53 y NF-kappaB), enzimas y proteínas estructurales. De este modo, estos complejos interviene en numerosos procesos fisiológicos y patológicos que involucra la señalización de RE, la

reproducción, el cáncer, entre otros. A continuación se describe la participación de las FKBP5s en algunos de estos procesos:

A) **Señalización de receptores esteroideos**

La primera caracterización funcional de FKBP51 y FKBP52 tuvo lugar mediante la descripción de las funciones de ambas INMs a nivel de la maduración, la unión a hormonas esteroideas y la translocación nuclear de RE.

En ausencia de ligando, algunos miembros de la familia de RE residen principalmente en el citoplasma y otros, son constitutivamente nucleares. Más allá de la distribución subcelular primaria, estos receptores oscilan continuamente entre el citoplasma y el núcleo (Galigniana, 2010).

Existen evidencias que sostienen que todos los RE existen como heterocomplejos oligoméricos formados principalmente por las chaperonas Hsp90, Hsp70, la co-chaperona p23 y proteínas que poseen el dominio TPR, tales como las INMs de alto peso molecular (Pratt, 1992; Pratt, 1997; Kost, 1989; Smith, 1990).

Durante más de una década, la activación de RE fue explicada mediante el conocido modelo clásico de translocación nuclear (Figura 6, panel superior). Este modelo sostiene que, al unirse la hormona al receptor, el heterocomplejo de Hsp90•RE se disocia inmediatamente (transformación). En consecuencia, se postula que la transformación favorecía la liberación del receptor de sus sitios de anclaje citoplasmáticos y la translocación nuclear de RE mediante el proceso de difusión. Una vez en el núcleo, el receptor regularía la transcripción de sus genes blancos (Dahmer, 1984). Estudios posteriores señalaron que el heterocomplejo Hsp90•RE•INM interacciona con el complejo motor dineína/dinactina. En sentido, FKBP52, CyP40 y PP5 son INMs redundantes en su capacidad para interactuar con el complejo dineína/dinactina, no así FKBP51 (Galigniana, 2001; Galigniana 2010). Más aún, se observó que Hsp90 es parte del heterocomplejo cuando el receptor de mineralocorticoides (MR) es nuclear. En efecto, si se entrecruzan químicamente los

miembros del complejo Hsp90•GR o HSP90•MR en células permeabilizadas con digitonina, éstos translocan juntos a través del poro nuclear. A esto se suma la evidencia de que el complejo de chaperonas interacciona con glicoproteínas integrales del poro nuclear (Nup62 y β -importina) (Echeverria, 2009; Galigniana, 2010).

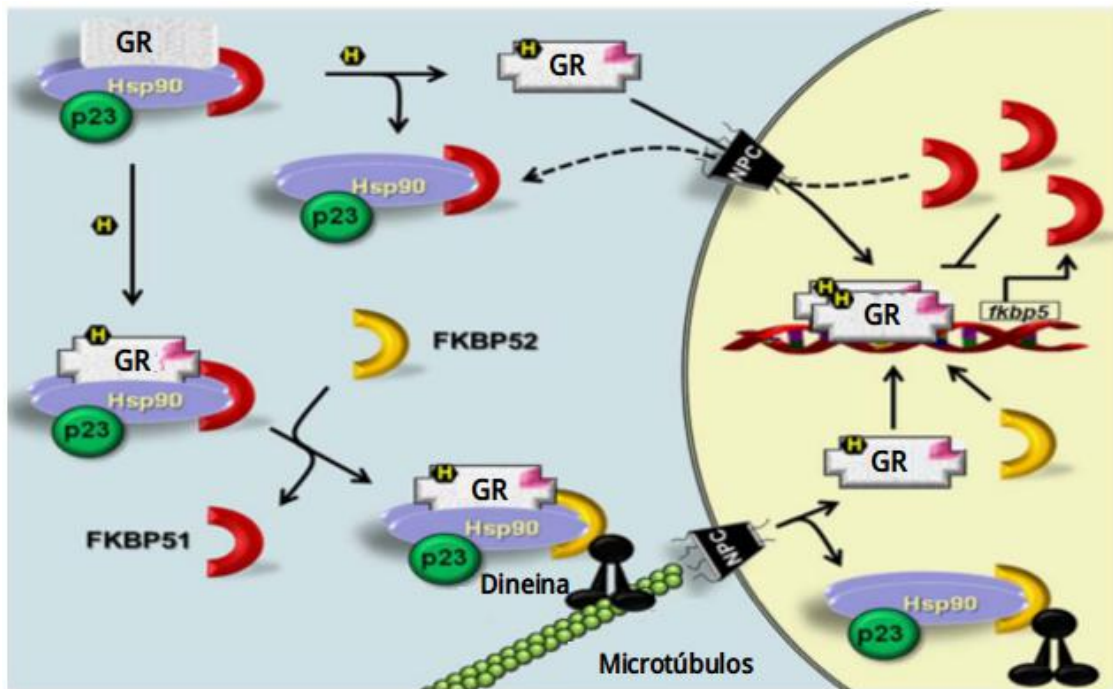


Figura 6. Mecanismo molecular de acción del receptor de glucocorticoides

De acuerdo al modelo clásico (panel superior), el heterocomplejo de Hsp90 se disocia tras la unión a la hormona. Esto permite un cambio conformacional del receptor que expone la señal de localización nuclear (coloreada en rosa). Luego de la difusión del receptor a través del citoplasma, éste transloca al núcleo en donde tiene lugar la regulación transcripcional. Por el contrario, el modelo moderno (panel inferior) sugiere que la unión de la hormona al heterocomplejo (GR•Hsp90) favorece el intercambio de FKBP51 por FKBP52, y la interacción con el complejo motor de dineína a través de esta última INM incorporada. En consecuencia, el heterocomplejo GR•Hsp90•FKBP52 se transporta activamente por la red de microtúbulos hacia al núcleo atravesando el complejo del poro nuclear (NPC). La transformación ocurre en el núcleo. Tanto FKBP51 y FKBP52 regulan la actividad transcripcional de GR. Uno de los genes regulados por GR es *fkbp5*. Este gen codifica para FKBP51, la cual promueve el bucle inhibitorio sobre la acción de GR. Figura adaptada de Mazaira, 2016.

El conjunto de hallazgos experimentales mencionados previamente, permitieron introducir importantes cambios en el modelo clásico (Figura 6, panel inferior). En ese contexto, se postuló que la unión de la hormona al complejo Hsp90•RE promueve el intercambio de FKBP51 por FKBP52. Esta última INM, capaz de reclutar al complejo motor dineína/dinactina, favorecería el transporte activo del heterocomplejo a lo largo de los microtúbulos y su translocación nuclear. Una vez en el núcleo, ocurriría la transformación y la dimerización del receptor, previo a la regulación de la transcripción de sus genes blancos. Vinculado al concepto de modelo alternativo de translocación nuclear de RE, se ha demostrado que FKBP51 y FKBP52 modulan la actividad transcripcional de RE. FKBP52 constituye un regulador positivo de la actividad transcripcional de GR (Mangelsdorf, 1995), PR (Evans, 1988) y AR (Cheung, 2005) mientras que, FKBP51 regula negativamente la actividad de varios RE (Galigniana, 2001; Harrel, 2004).

B) Participación de FKBP5s en la reproducción

Mediante el estudio de líneas de ratones deficientes de FKBP52 (52KO), fue posible determinar el rol de FKBP52 en el área de reproducción. Se observó que ratones machos 52KO presentaban un fenotipo comparable a un cuadro de insensibilidad parcial a andrógenos (malformación de próstatas y vesículas seminales), ambigüedad genital (hipospadia) y retención de pezones en el adulto (Cheung, 2005; Yong, 2007). A pesar de la insensibilidad a andrógenos, los testículos de los ratones 52KO se desarrollaron normalmente. A nivel del epidídimo, se han detectado anomalías en el número, en la morfología y una movilidad reducida de los espermatozoides (Hong, 2007). Se especula que FKBP52 interacciona con el complejo motor de dineína y que esto, contribuiría al movimiento del flagelo de los espermatozoides.

Por su parte, los ratones hembras 52KO son morfológicamente normales. Presentan una ovulación y fertilización normal, pero son infértiles. La infertilidad es el resultado de una implantación embrionaria deficiente, y/o falla en la decidualización, provocada por la insensibilidad a progesterona y/o a defectos uterinos (Tranguch, 2005; Yang, 2006). La resistencia a la progesterona observada en los ratones 52KO resulta en un incremento en la proliferación celular, inflamación y angiogénesis conllevando a lesiones endométricas (Hirota, 2008). En este sentido, se ha observado que mujeres con endometriosis presentan una expresión reducida de FKBP52.

Alteraciones en la implantación pueden responder a un incremento del estrés oxidativo uterino. En ese sentido, efectuando un análisis proteómico se encontró que los niveles uterinos de la peroxiredoxina-6 (PRDX6), una enzima antioxidante, están significativamente disminuidos en los ratones 52KO. Bajos niveles de PRDX6 y altos valores de estrés oxidativo se correlacionaron con fallas en la implantación, que persisten aún con el suplemento de progesterona. Dichas alteraciones en la implantación pudieron ser atenuadas mediante el tratamiento con antioxidantes α -tocoferol y N-acetilcisteína (NAC) (Hirota, 2010).

Además de las fallas en la implantación, se ha determinado que la expresión deficiente de FKBP52 estaría relacionada con otros trastornos útero-placentarios. Cabe mencionar como ejemplos a los abortos recurrentes, la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino (Acar, 2015).

En el caso de ratones deficientes de FKBP51 (51KO) no se observaron alteraciones morfológicas. Sin embargo, la pérdida mutua de FKBP51 y FKBP52 (51/52KO) genera la letalidad embrionaria cuya causa aún no ha sido investigada.

C) Papel de las FKBP5 sobre la proliferación celular y el cáncer

En los últimos años, FKBP51 ha adquirido gran interés en el estudio del cáncer y el desarrollo de terapias antineoplásicas. Dependiendo del tipo de cáncer,

alteraciones en la expresión de FKBP51 generan una modulación variable sobre el crecimiento tumoral y el comportamiento neoplásico (Avellino, 2005; Mukaide, 2008).

A diferencia de FKBP51 cuya expresión es regulada hormonalmente, FKBP52 es ubicuamente expresada en todos los tejidos y ligeramente aumentada en condiciones de estrés celular (Sanchez, 1999).

Poco se conoce del rol de FKBP52 en el cáncer. En cáncer de mama, se detectó que la expresión de FKBP52 está incrementada y el patrón de metilación de su gen varía en función de la dependencia del tumor a la hormona estrógeno. Estas observaciones sugieren un potencial rol de FKBP52 en la tumorigénesis y/o progresión del cáncer de mama (Ward, 1999; Hong, 2017).

D) Papel de FKBP51 en trastornos psiquiátricos

Dada la percepción de una situación estresante, el hipotálamo produce la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La hormona CRH promueve la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) desde la pituitaria y en consecuencia, incrementa los niveles de cortisol procedentes de la glándula adrenal. El cortisol causa una retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis y núcleos paraventriculares, reduciendo la liberación de ACTH y CRH respectivamente. Los efectos del cortisol se ejercen, en parte, por la unión de la hormona a GR.

El gen *fkbp5*, codificante de la proteína FKBP51, es inducido por la unión de GR a secuencias promotoras e intrónicas específicas (GREs por sus siglas en inglés *GR Response Elements*). La INM FKBP51 se une al heterocomplejo GR provocando la reducción de afinidad de GR por el cortisol y la translocación de GR al núcleo. Mediante este bucle regulatorio, FKBP51 es capaz de regular la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) que controla la respuesta al estrés y está asociado con la susceptibilidad a la depresión (Touma, 2009).

Está reportado que el polimorfismo de una sola base en el gen *fkbp5* y la regulación epigenética alelo-específica están relacionadas con el riesgo de desarrollar trastornos psiquiátricos asociados con el estrés, como la depresión mayor y el trastorno de estrés post-traumático (Binder, 2004).

E) FKBP5 y tautopatías neurodegenerativas

Investigaciones recientes señalan que tanto FKBP51 y FKBP52 regulan la dinámica de ensamblado de los microtúbulos. Los microtúbulos se estabilizan por la unión de la proteína tau en la conformación cis. Sin embargo, al fosforilarse tau cambia de conformación, y por ende, pierde afinidad por los microtúbulos, favoreciendo su despolimerización. Los heterocomplejos Hsp90•FKBP son capaces de unirse a tau en su forma trans fosforilada. Cuando FKBP51 es parte del heterocomplejo, la INM cataliza la isomerización tau a su forma cis, permitiendo que la fosfatasa PP5 acceda a tau y lo desfosforile. De esta manera, tau queda nuevamente disponible para unirse y estabilizar microtúbulos. Por el contrario, cuando FKBP52 se une a tau, esta permanece fosforilada, en su forma trans (Chambraud, 2010; Jinwal, 2010). Existen evidencias de que FKBP52 promueve la formación de agregados insolubles (Giustiniani, 2014).

Si bien FKBP52 está ubicuamente expresado en todos los tejidos, es particularmente abundante en el sistema nervioso central. Más aún, FKBP52 está involucrado en tautopatías neurodegenerativas que incluyen a la enfermedad de Alzheimer, a la enfermedad de Pick, la demencia fronto-temporal y el parkirsonismo asociado al cromosoma 17 (FTDP). Las tautopatías son el resultado de la hiperfosforilación de tau que conduce a la formación de agregados insolubles u ovillos neurofibrilares dentro de las neuronas (Cao, 2011).

F) Regulación de la respuesta inmune mediada por FKBP51

Los factores de transcripción NFAT y NF-kappaB juegan un papel crítico en la inducción de numerosos genes que codifican para citoquinas en linfocitos T activados (Shaw, 1988; Weschler, 1988).

Varios estudios indican que FKBP51 participaría en procesos inflamatorios y enfermedades inmunes, mediante la regulación de NFAT y NF-kappaB (Li, 2002; Nakamura, 2006; Jiang, 2008).

2. Factores de transcripción: NF-kappaB y AP-1

2.1. Factor nuclear kappa B (NF-KappaB)

El factor nuclear kappa B (NF-kappaB) fue descubierto por primera vez en 1986 como una proteína capaz de unirse a la secuencia potenciadora del gen que codifica para la cadena ligera kappa de inmunoglobulinas en los linfocitos B (Sen R, 1986).

Este factor de transcripción es activado por una gran variedad de estímulos incluyendo citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, especies reactivas de oxígeno (EROs), entre otros. En células no estimuladas, NF-kappaB se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, asociado con una familia de proteínas inhibitorias llamadas IkappaB. El mecanismo clásico de activación de NF-kappaB consiste en la fosforilación de IkappaB a través de la proteína quinasa IkappaB (IKK). Una vez fosforilado IkappaB es blanco de ubiquitinización y subsecuentemente de degradación vía proteosoma. Esta secuencia de eventos permite la liberación de NF-kappaB que transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes específicos (Beinke, 2004).

Entre las respuestas celulares relacionadas a la activación de NF-kappaB se encuentran: la activación de células del sistema inmune a través de la inducción de

citoquinas y la regulación de numerosos procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la oncogénesis (Karin, 2002).

NF-kappaB está constituido por proteínas de la familia Rel, capaces de formar homo o heterodímeros. De todas las proteínas de la familia de NF-kappaB, los miembros p50 y Rel A (o p65) forman el heterodímero más ubicuo y abundante en los distintos tipos celulares de los mamíferos.

Recientemente, hemos demostrado que FKBP51 y FKBP52 afectan la translocación nuclear de Rel A y la actividad transcripcional de NF-kappaB. En ese contexto, observamos que FKBP51 retrasa la translocación nuclear de RelA, ocasionando un efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional. Este efecto estaría relacionado a su incapacidad de interactuar con el complejo motor dineína/dinactina. Por el otro lado, FKBP52 prolonga la retención nuclear de RelA y produce un marcado efecto estimulador sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB (Erlejman, 2014) (Figura 7).

Más allá de las características comunes, existen claras diferencias en el efecto regulador de las FKBP5s sobre los factores nucleares RE y NF-kappaB. En contraste con RE, los efectos de las FKBP5s sobre NF-kappaB son independiente de Hsp90. Cabe mencionar que mutantes puntuales del dominio TPR de las FKBP5s no se unen a Hsp90 y promueven efectos similares a las INMs salvajes sobre NF-kappaB. Esta independencia funcional de Hsp90 constituye un mecanismo novedoso de la regulación de RE, donde la activación dependiente del ligando y la actividad transcripcional si son dependientes de Hsp90 (Erlejman; 2014). No obstante, se ha observado que la chaperona Hsp90 interviene en la vía de activación de NF-kappaB formando complejos con FKBP51 y IKK. Si bien hoy en día se desconoce la función de este heterocomplejo, se cree que está asociado al ensamblado de Cdc37, el principal factor de los complejos de IKK maduros (Hinz, 2007).

Otro rasgo a destacar es la importancia funcional de la actividad PPIasa de las FKBP5s. La actividad PPIasa de FKBP52 resulta ser condición indispensable para la

modulación positiva de NF-kappaB, no así para FKBP51 que no requiere de dicha actividad enzimática para su acción inhibitoria (Erleiman, 2014).

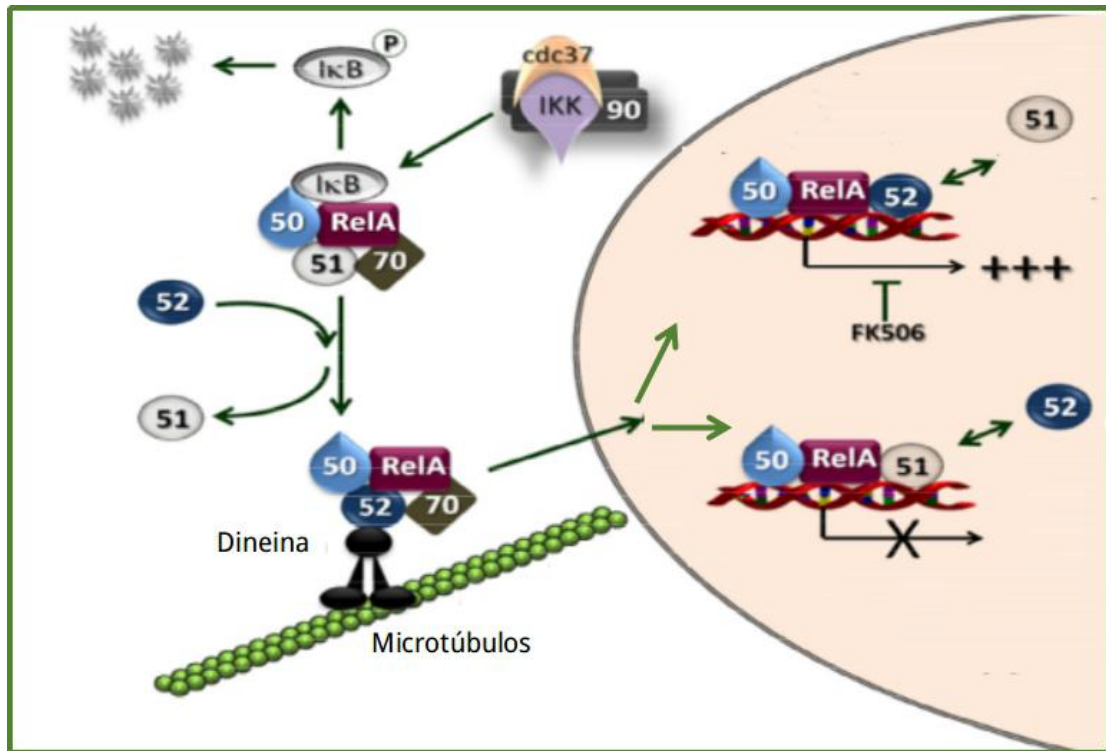


Figura 7. Regulación de la acción biológica de NF-kappaB por FKBP5

En su estado inactivo, el dímero p50•RelA está asociado a su inhibidor IκappaB, FKBP51 y Hsp70. Dado el estímulo, IKK fosforila a IκappaB y lo disocia del complejo, favoreciendo el intercambio de FKBP51 por FKBP52. En consecuencia, IκappaB se degrada vía proteosoma y el dímero p50•RelA transloca al núcleo. Ambas FKBP5 regulan la actividad transcripcional de NF-kappaB y compiten entre sí, donde FKBP51 inhibe y FKBP52 activa. Figura adaptada de Erleiman, 2014.

2.2. Proteína activadora (AP-1)

La familia de FTs de la proteína activadora 1 (AP-1, según su siglas en inglés *Activating Protein 1*) fue descrita por primera vez cuando se aisló un complejo proteico que se unía específicamente a secuencias de ADN de ciertos promotores, como el del gen de la metalotioneína humana Ila o los elementos activadores del virus “simian virus 40” (Angel, 1987; Lee, 1987). Dado que la actividad transcripcional de estos genes se induce en respuesta al éster de forbol acetato de

tetradecanoilforbol (TPA), el complejo AP-1 fue relacionado, al principio, con secuencias denominadas elementos TRE (TRE, según su siglas en inglés *TPA Response Element*). Tiempo después, se identificaron los componentes que formaban parte del complejo AP-1 (c-Fos y c-Jun) mediante cromatografía de afinidad con oligonucleótidos de la secuencia TRE (Perkins, 1988).

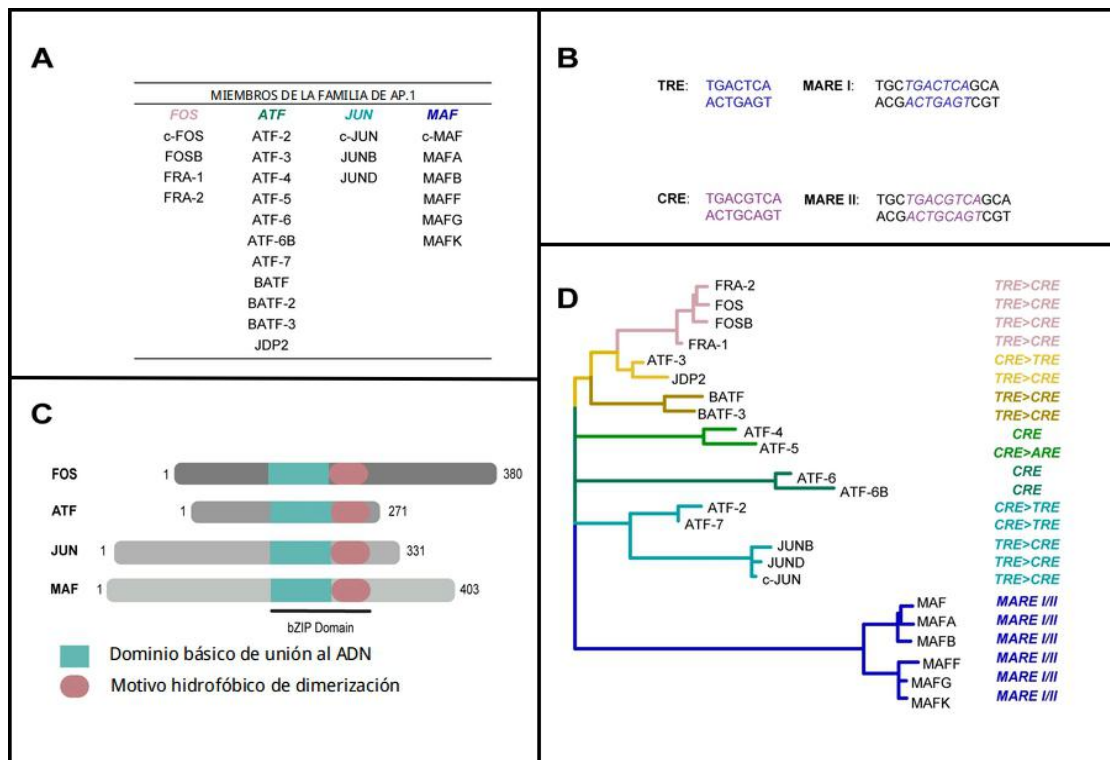


Figura 8. Miembros de la familia del factor de transcripción AP-1

A. Tabla donde figuran los diferentes factores de transcripción de AP-1 de los subgrupos FOS, ATF, JUN Y MAF.

B. Secuencias de unión al ADN que los factores de AP-1 reconocen y a los cuales se unen. El elemento TRE es el más común; sin embargo dependiendo de la configuración del dímero, AP-1 puede unirse a otros elementos como CRE, MARE I y MARE II.

C. Representación esquemática de la estructura proteica de los factores AP-1 Esta familia comparte dos regiones comunes: el motivo básico de unión al ADN y el motivo de cremallera de leucinas, juntos forman el dominio bZIP.

D.Árbol filogenético del factor de transcripción de AP-1 y sus secuencias de unión al ADN. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas con ClustalW y Bioedit 7.0.8.0. El árbol de máxima probabilidad fue calculado con MEGA 7.0.2.1 aplicando parámetros obtenidos de Modeltest.

Figura adaptada de Alonso, 2018.

Hoy en día, AP-1 hace referencia a un complejo dimérico compuesto por 4 subfamilias de proteínas: **Fos** (c-Fos, Fosb, Fra -1 o FOSL-1 y Fra-2 o FOSL-2), **Jun** (c-Jun, JunB y JunD), **MAF** (c-Maf, MafB, MafA, (MafG/F/K y NRL) y **ATF** (ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ATF6, ATF6B, ATF7, BATF, BATF-2, BATF-3 y JCP2). Los criterios de clasificación actuales se basan en las diferentes propiedades de unión al ADN y de dimerización de las cuatro subfamilias (Shaulian, 2002; Eferl, 2003) (Figura 8).

Un requisito indispensable para que las proteínas AP-1 se unan a sus secuencias consenso en el ADN es la dimerización de los FTs. Mientras que las proteínas de la subfamilia Jun pueden formar homo u heterodímeros con proteínas de la subfamilia Fos, éstas últimas solo son capaces de heterodimerizar con miembros de la familia AP-1. Dependiendo de como se combinen entre sí, la estabilidad del complejo dimérico varía como así también la secuencia de ADN blanco que no necesariamente corresponde a la tradicional secuencia TRE (Angel, 1991).

2.2.1. Características estructurales de AP-1

La proteína c-Fos presenta dos dominios funcionales: **el dominio básico de cierre de leucinas b-ZIP** (región básica de unión al ADN y un motivo hidrofóbico responsable de la dimerización) y **el dominio de transactivación** (necesario para la activación transcripcional de genes dianas).

Cabe destacar que el dominio b-ZIP constituye la característica común de los factores de transcripción de la familia de AP-1 (Glover, 1995). Este dominio presenta un motivo de dimerización denominado cremallera de leucinas que consiste en dos α -hélices. Cada una de ellas consta de repeticiones de residuos de leucina cada 7 aminoácidos, dando en su conjunto una banda hidrofóbica rica en

leucinas en la cara interna de la hélice, y de aminoácidos cargados (principalmente ácido glutámico, glutamina, lisina y arginina) en la cara externa (Rasmussen, 1991; Vinson, 2002).

2.2.2. Regulación de la vía de activación de AP-1

La regulación de AP-1 ocurre, principalmente, a nivel de la transcripción y de las modificaciones postraduccionales (fosforilación/desfosforilación) de los miembros de la familia de AP-1.

A nivel transcripcional, la modulación de la transcripción de Fos y Jun involucra a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Benkoussa, 2002; Bruna, 2003).

Las MAPKs son una familia de proteínas quinasas cuya función y regulación se ha conservado durante la evolución desde organismos unicelulares hasta organismos más complejos, como el ser humano (Widmann, 1999; Kyriakis, 2001). Esta familia de serinas-treoninas quinasas (Ser-Thr quinasas) pueden ser activadas por un gran número de estímulos extracelulares, tales como la radiación ionizante, EROs, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, entre otros (Cohen, 1997; Cuenda, 2007).

Las MAPKs constituyen un sistema de amplificación en cascada. En esta cascada están implicadas normalmente tres proteínas homólogas, una MAPKKK, una MAPKK y una MAPK. (Santen, 2002). Las MAPKKKs contienen un dominio Ser-Thr quinasa C-terminal. Tras un estímulo específico, la MAPKKK fosforila dos residuos de Ser o Thr de posiciones conservadas en el dominio de activación de su MAPKK diana, la cual es una proteína quinasa de especificidad dual (Ser/Thr y Tyr). La MAPKK activada fosforila ambos residuos de Thr y Tyr de un motivo–Thr-X-Tyr– conservado, en el dominio de activación de su proteína MAPK blanco. Paso siguiente, la MAPK fosforila los residuos Ser/Thr del motivo -Ser/Thr-Pro- de distintas proteínas sustratos, generando una gama amplia de respuestas biológicas

que incluyen la modificación de la expresión génica, la regulación del metabolismo, cambios en la morfología celular o en la progresión del ciclo celular (Cohen, 2002) (Figura 9) .

En organismos multicelulares existen tres subfamilias de MAPKs bien caracterizadas. Estas subfamilias son las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK (ERK1 y ERK2), las quinasas c-Jun NH2-terminal (JNK1, JNK2 y JNK3) y las enzimas p38 (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ). Otras MAPKs, ERK5 y ERK7, han sido identificadas aunque poco se conoce de ellas (Johnson, 2002).

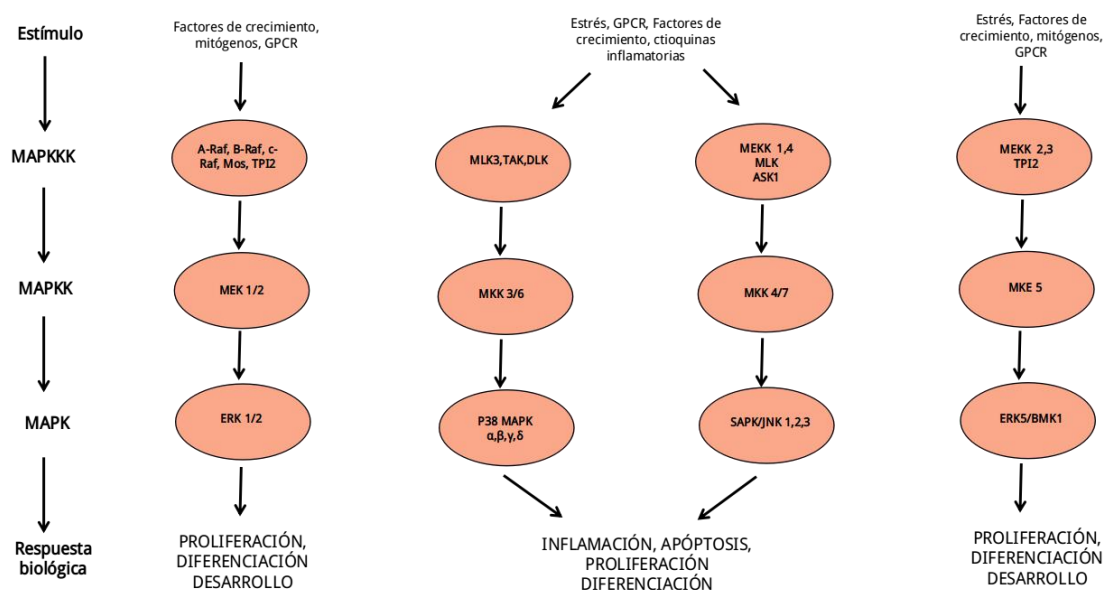


Figura 9. Cascadas de señalización de las quinasas activadas por mitógenos

La señalización de MAPKs se organiza en diferentes cascadas que regulan diferentes funciones celulares y se organizan jerárquicamente en 3 módulos (MAPKKK/MAPKK/MAPK). Figura adaptada de Cell Signaling Technology, Inc.

La inducción de las vías de las MAPKs es transitoria. Su retorno al estado basal depende fundamentalmente de fosfatasa que reconocen la forma fosforilada de la MAPK y la desfosforilan una vez que la célula ha respondido al estímulo extracelular o se ha adaptado a las nuevas condiciones (Martín, 2005). Aunado a esto, la especificidad de cada ruta se modula en varios estratos ya sea por el reclutamiento de quinasas que intervienen en la ruta mediante proteínas de andamiaje, por

interacciones específicas entre componente de la misma vía o por otros mecanismos modulados por las propias MAPKs mediante retrofosforilación (Molina, 2010). Sin embargo, para responder a ciertos estímulos, puede ser necesaria la comunicación entre diferentes vías (Fey, 2012).

2.2.3. Funciones de AP-1

La función general del complejo AP-1 es la regulación de la transcripción de genes específicos en respuesta a diferentes estímulos, entre los que se incluyen factores de crecimiento, EROs, citoquinas, neurotransmisores y radiación ionizante (UV) (Angel, 1991).

Dada su capacidad de unirse a promotores de un amplio espectro de genes, los FTs de la familia AP-1 están involucrados en numerosos procesos celulares, tales como proliferación, migración, diferenciación, supervivencia, apoptosis, respuesta a estrés y transformación oncogénica (Eferl, 2003; Vesely, 2009). La contribución de AP-1 en estos procesos celulares depende de la abundancia relativa de los miembros de la familia, la composición de los dímeros, el tipo celular y el estímulo (Angel, 1991; Karin, 1995; Karin, 1997).

2.2.4. Participación de AP-1 en diferentes enfermedades humanas

Alteraciones en la expresión de los miembros del complejo de AP-1 tienen una contribución significativa en el inicio o progresión de varias enfermedades humanas. A continuación, se menciona la participación de AP-1 en procesos inflamatorios y patologías de distinta naturaleza:

A) AP-1 e inflamación

En el curso de la inflamación, las células inmunes se activan. Una variedad de citoquinas y quemoquinas, principalmente reguladas por AP-1 (y otros FTs como NF-kappaB y NFAT), son reclutadas al sitio de inflamación. Una activación inapropiada del sistema inmune puede resultar en una sobrepoblación de células inmunes y en un marcado incremento de componentes inflamatorios (citoquinas inflamatorias y proteasas) que favorezcan, en su conjunto, la aparición de desórdenes inflamatorios (artritis reumatoidea, asma, psoriasis, entre otras). Curiosamente, los genes que codifican para distintas citoquinas son regulados cooperativamente por AP-1 y NFAT. De hecho, se cree que AP-1 es un factor proinflamatorio que modula directamente la expresión de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 6 (IL-6), el IFN γ , el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y las metaloproteasas de la matriz (MMPs) (Gutman, 1990; Sirum-Connolly, 1991; Angel, 1997; Karin, 1997; Angel, 2001).

B) AP-1 y cáncer

Hay evidencia creciente que sugiere que altos niveles de AP-1 están asociados a una variedad de cánceres humanos (Eferl, 2003). Numerosos miembros de la familia AP-1 tales como c-Fos, FosB y c-Jun contienen dominios de transactivación, que les confiere la capacidad de inducir la transcripción de genes específicos y transformar eficientemente las células en cultivo. Otras proteínas de AP-1 presentan una baja (Fra1 y Fra2) o nula actividad de transformación (JunB y JunD). Sin embargo, todos estos miembros de AP-1 están activamente involucradas en el desarrollo y progresión de tumores (Foletta, 1994; Bergers, 1995; Vandel, 1995; Wolfram, 2001).

C) AP-1 y otras enfermedades humanas

Además del rol de AP-1 en cáncer, se ha demostrado que alteraciones en la expresión de AP-1 contribuyen significativamente a la aparición y/o progresión de otras enfermedades humanas, que incluyen la hepatitis, fibrosis pulmonar, aterosclerosis y enfermedad de Parkinson (Eferl, 2008; Muslin, 2008; Yang, 2010; Wang, 2011).

2.2.5. El factor de transcripción c-Fos

El gen fos fue descrito, por primera vez, al aislarse el oncogen viral (v-fos) del osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jenkins (Curran, 1982). Años después, se descubrió su variante homóloga (c-fos) en células murinas. Las proteínas Fos fueron caracterizadas, posteriormente, como FTs y miembros de la familia de AP-1 (Curran, 1984; Sambucetti, 1986; Rauscher, 1988a; Rauscher, 1988b)

El gen humano c-fos se expresa constitutivamente en diferentes tejidos embrionarios y adultos. Por lo general, en condiciones basales, los niveles de expresión de c-fos resultan muy bajos o indetectables, con excepción de ciertos tejidos que forman el saco vitelino, el amnios y la piel humana (Ferrara, 2003). También, se ha reportado que c-Fos es abundante en un gran número de células tumorales (Yuen, 2001; Mahner, 2013)

Por ser un gen de respuesta temprana (IEG, según sus siglas en inglés *Immediate early gene*), c-fos (al igual que c-jun) muestra una expresión rápida y transitoria en respuesta a estímulos (intra o extracelulares) en ausencia de síntesis de proteínas de novo (Herdegen, 1998). Ya sintetizada, la proteína c-Fos es altamente inestable. Los niveles de c-Fos se acumulan por un corto período de tiempo hasta alcanzar su máximo y luego, decrecen rápidamente por degradación proteosómica (Kovacs, 2008).

2.2.5.1. Características estructurales de c-Fos

La proteína c-Fos cuenta con dominios o motivos estructurales y funcionales característicos (Sutherland, 1992; Acquaviva, 2001). Entre los que se incluye:

- a) el **dominio bZIP**, responsable de la unión al ADN y dimerización
- b) los **dominios de activación de Fos (FAM)** actúan cooperativamente entre sí y su actividad depende, en parte, de las cajas de homología HOB
- c) el **dominio inhibidor (ID1)** inhibe a HOB1 ubicado en el extremo N-terminal
- d) los **dominios desestabilizadores (PEST)** son regiones implicadas en la degradación, ricas en aminoácidos prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina y treonina.

2.2.5.2. Regulación de la actividad de c-Fos

Regulación de la expresión de c-fos a nivel de la activación transcripcional

Una gran variedad de estímulos puede inducir al promotor de c-fos. Entre ellos, múltiples factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado plaquetas (PDGF), el suero, ésteres de forbol como el TPA o el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) mediante la activación de la vía de la proteína quinasa C (PKC), citoquinas, EROs o radiaciones ionizantes (Janknecht, 1995).

Existen múltiples elementos cis que intervienen en la regulación transcripcional de c-fos. Entre los que se pueden mencionar a el elemento de respuesta a suero (**SRE**), el elemento inducible por c-Sis (**SIE**), el elemento de respuesta al AMPc (**CRE**) y un **sitio AP-1/CRE** (He, 2009) (Figura 10).

El elemento SRE está involucrado en la inducción de c-fos en respuesta a ésteres de forbol, factores de crecimiento (EGF, PDGF e insulina) y radiación UV de manera dependiente e independiente de PKC.

En el elemento SIE se unen tanto los miembros de la familia de transductores y activadores de las señales de transcripción (STATs), como el factor de transcripción II (TFII) (Yang, 2003).

El sitio CRE es reconocido principalmente por la proteína CREB activada vía PKA o de CaM quinasa en respuesta a cambios en el calcio intracelular (Gonzalez, 1989; Bito, 1996).

Finalmente, el sitio AP-1 une tantos heterodímeros de AP-1 como también factores de transcripción CREB/ATF2.

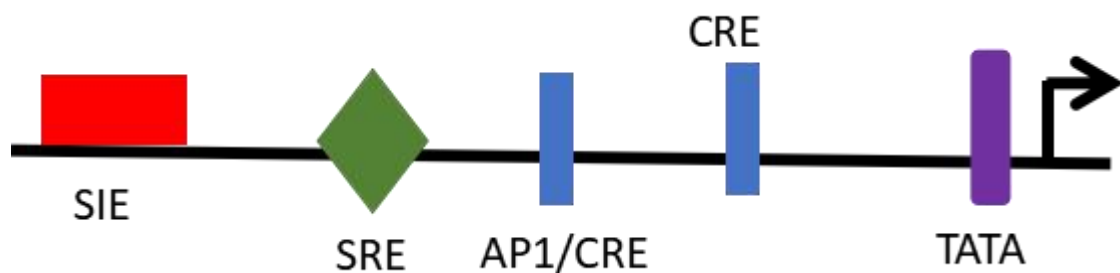


Figura 10. Esquema del promotor de c-fos

Representación de los distintos elementos de unión a factores de transcripción del promotor de c-fos y la ubicación de los mismos de 5' a 3': el elemento SIE, un elemento SRE, un elemento AP-1/CRE y el elemento CRE.

Modificaciones postraduccionales de c-Fos

- *Modificaciones postraduccionales de c-Fos: Fosforilación*

Una de las modificaciones postraduccionales más comunes, que afecta la actividad y vida media de c-Fos, es la fosforilación.

En función del tipo de estímulo, c-Fos puede ser fosforilado secuencialmente en distintos residuos por diversas quinasas: **MAPKs y las quinasas relacionadas a c-Fos (FRKs).**

Dentro de las MAPKs, mencionamos a ERK1/2, JNKs, p38, ERK7, ERK5. Mientras que dentro de la familia de las quinasas FRKs, resaltamos a PKA, PKC y Cdc2 (Abate, 1991; Monje, 2003; Terasawa, 2003; Tanos, 2005).

Dado un estímulo mitogénico, se postula que ERK y/o RSK translocan al núcleo y fosforilan a c-Fos. Como consecuencia de la acción de estas quinasas, ERK 1/2 se une a c-Fos en un sitio específico denominado DEF y favorece fosforilaciones posteriores en el extremo C-terminal. Subsecuentemente, esta secuencia de eventos resulta en cambios en la localización nuclear, tasa de unión a secuencias de ADN dianas y actividad transcripcional de AP-1 (Murphy, 2002).

Regulación de la actividad AP-1 por interacciones proteína - proteína

La importancia de las interacciones proteína-proteína en la regulación de la actividad de AP-1 queda demostrada con la participación de c-Fos en distintos complejos diméricos que incluyen: 1) miembros de la familia AP-1, 2) FTs con dominios bZip (Nrf-1, Nrf-2), 3) FTs sin dominio bZip (NFAT, Ets, NF-kappaB) y 4) otras proteínas, por ejemplo la lámina A/C (Chinenov, 2001; Ivorra, 2006; Gonzalez, 2008).

2.2.6. El factor de transcripción c-Jun

La proteína c-Jun fue originalmente identificada como una oncoproteína del sarcoma aviar codificada por el virus 17 (v-Jun). Estudios posteriores demostraron que c-Jun es un miembro de la familia AP-1 y que existen otras variantes de la familia Jun tales como JunB y JunD (Vogt, 1990).

Si bien los miembros de la familia Jun comparten un cierto grado de homología estructural, presentan patrones de expresión y funciones diferentes. Por un lado, los genes junB y c-jun son considerados IEGs pues dado un estímulo específico, manifiestan una rápida inducción de la transcripción. Por otro lado, el gen junD se

expresa predominantemente en células quiescentes y su sobreexpresión en células proliferativas disminuye la tasa de proliferación de las mismas (Wang, 1996).

De los tres miembros de la familia de proteínas Jun, c-Jun es el único capaz de transformar fibroblastos mientras que JunB y JunD inhiben dicho proceso (Pfarr, 1994; Passequé, 2000).

2.2.6.1. Características estructurales de c-Jun

Como previamente habíamos mencionado, las proteínas de la familia Jun comparten ciertas homologías estructurales. En su extremo N-terminal, cuentan con el sitio de unión (región delta) y de fosforilación de la quinasa JNK. Mientras que en su extremo C-terminal, se dispone el dominio bZip.

La oncoproteína viral v-Jun difiere de c-Jun por la existencia de una delección de 27 aminoácidos en el dominio N-terminal, responsable de la activación transcripcional, además de presentar diferentes mutaciones puntuales. Asimismo, JunB contiene un sitio de acoplamiento para JNK pero carece de los sitios de fosforilación consenso de c-Jun (S63/S73). La situación inversa se presenta para la proteína JunD (Adler, 1992; Hibi, 1993, Davis; Sluss, 1994).

2.2.6.2. Regulación de la actividad de c-Jun

La fosforilación de S63/S73 en la región N-terminal de c-Jun activa su acción sobre la transcripción génica y la protege de la degradación proteolítica dependiente de ubiquitina (Pulverer, 1991; Smeal, 1991). Esta fosforilación es llevada a cabo por la quinasa JNK, en respuesta a distintos estímulos; entre los cuales, se incluyen los agentes mitogénicos y los factores de estrés celular (Johnson, 2007).

La CK2 es capaz de fosforilar los residuos T231/ S249 que se encuentran en la región C-terminal de c-Jun. La fosforilación de los residuos T231/ S249 promueve una disminución de la unión al ADN y de la actividad transcripcional de c-Jun. La acción de CK2 es inhibida por acción PKC. De este modo, PMA puede actuar indirectamente sobre PKC, causando la activación de AP-1 (Papavassiliou, 1993).

La proteína v-Jun cuenta con modificaciones de secuencia que impiden la regulación de su actividad biológica. Por ejemplo, la delección de la región delta amino-terminal elimina la región delta y evita la fosforilación de S63/S73. Más aún, la mutación puntual del residuo S243 anula la fosforilación de los residuos T231 y S249 adyacentes por la CK2 (Lin, 1992). El resultado es una proteína v-Jun activa constitutivamente.

3. AP-1 y NF-kappaB en placenta

La placenta es un órgano efímero y especializado que se desarrolla desde los inicios de la preñez. Sus principales funciones consisten en garantizar tanto la supervivencia como el crecimiento del embrión dentro del ambiente uterino materno. En la placentación hemicorial (característica de roedores, primates y humanos), la sangre materna baña directamente las células extraembrionarias llamadas trofoblastos. Estas células epiteliales surgen tempranamente en el desarrollo embrionario. Son indispensable para múltiples procesos biológicos de implantación, adaptación inmunológica y establecimiento de la circulación materno-fetal.

Existen diferentes fenotipos de células trofoblásticas que forman la placenta (Figura 11). Los citotrofoblastos son células mononucleares capaces de proliferar y diferenciarse en diferentes subtipos trofoblásticos; constituyen los precursores del sincitiotroflasto y del trofoblasto extraveloso. Por un lado, un grupo de citotrofoblastos se fusionan unos con otros y atraviesan una diferenciación bioquímica, dando lugar al sincitiotrofoblasto multinuclear. La capa sincicial carece de actividad proliferativa y está en íntimo contacto con la sangre materna. Estas células participan en el intercambio materno-fetal de nutrientes, gases y desechos, como también en la biosíntesis de numerosas hormonas fundamentales para la gestación. Por el otro lado, un conjunto de citotrofoblastos adquiere propiedades invasivas, formando el trofoblasto extraveloso. Este tipo celular es capaz de invadir y remodelar tejidos maternos (trofoblasto extraveloso intersticial) y arteriolas

uterinas espiraladas (trofoblasto extravascular endovascular), reduciendo la resistencia al flujo de sangre materno que irriga el feto. Todas las subpoblaciones de células trofoblásticas interactúan entre sí y con otras células placentarias, tales como células de Hofbauer, células deciduales, endoteliales, musculares, entre otras. Este conjunto de interacciones favorece el establecimiento de un microambiente indispensable para el desarrollo de la placenta y del embrión/feto (Lunghi, 2007; Huppertz, 2008).

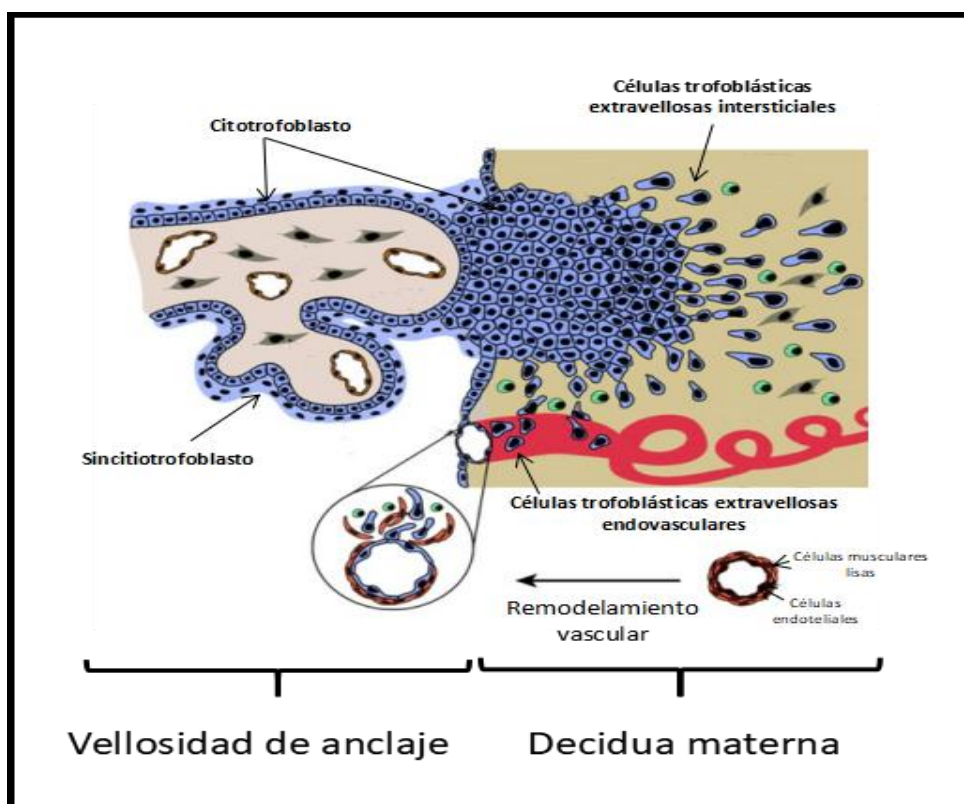


Figura 11. Subpoblaciones de células trofoblásticas

Los citotrofoblastos proliferan y se diferencian en diferentes subpoblaciones. El sincitiotrofoblasto se forma por la fusión de citotrofoblastos. Los citotrofoblastos pueden adquirir propiedades invasivas, y migrar hacia la decidua y el miometrio materno. Así se produce la invasión intersticial del estroma (trofoblasto extravascular intersticial) y la invasión trofoblástica endovascular de las arterias espirales (trofoblasto extravascular endovascular). Figura adaptada de Knöfler, 2013.

3.1. Distribución de AP-1 y NF-kappaB en placenta

Factor de transcripción AP-1: con la excepción de c-Jun y JunD, la mayoría de los miembros de la familia AP-1 están ausentes en los cito y sincitiotrofbastos, obtenidos de muestras del primer y tercer estadio de embarazo. Curiosamente, la situación inversa se presenta en el trofoblasto extraveloso, en los cuales c-Jun, JunD, c-Fos y Fra-2 son abundantes (Bamberger, 2004).

Factor de transcripción NF-kappaB: existe escasa información referente a NF-kappaB en tejidos gestacionales. Hasta la actualidad, se ha encontrado a las subunidades NF-kappaB, p50 y RelA en el amnios, en células miometrales, en citotrofbastos humanos y coriodecidua (Rosen, 1998; Allport, 2000 ; Kniss, 2001; Lappas, 2002).

3.2. Funciones reportadas para AP-1 y NF-kappaB en placenta

Factor de transcripción AP-1: Se ha observado que AP-1, particularmente la subfamilia Fos, está involucrada en diversas funciones trofoblásticas de organismos con placentación hemicorial (Kent, 2011; Renaud, 2013). Aunado a esto, se ha demostrado que los miembros de la subfamilia Fos regulan en forma diferencial los procesos de proliferación, migración e invasión (Van Meir, 1997; Peters, 2000; Renaud, 2013). Además de las funciones previamente descritas, AP-1 intervendría en la regulación del proceso de sincialización. En tal sentido, se ha identificado el motivo CRE/AP-1 en el promotor de la proteína retroviral Sincitina 2, conocida por su participación en la fusión trofoblástica. Entorno a esta observación, se demostró que CREB2 (ATF4) y JunD interaccionan con esta secuencia reguladora. Además mutaciones del motivo CRE/AP-1 afectan significativamente la expresión de sincitina 2 (Toufaly, 2015).

Factor de transcripción NF-kappaB: poco se sabe del rol funcional de NF-kappaB en la placenta. Sin embargo, la información disponible sugiere la importancia de NF-kappaB en la regulación de citoquinas proinflamatorias, tales

como IL-6, IL-8 y TNF- α en la coriodecidua y el amnios, donde también modula la expresión de COX-2 (Blackwell, 1997; Allport, 2000; Lappas, 2002).

3.3. Participación de AP-1 y NF-kappaB en enfermedades placentarias

A) Regulación de las metaloproteasas de la matriz (MMPs)

En la actualidad, muchos estudios se enfocan en conocer el papel que desempeñan las MMPs en aquellas enfermedades en las que la pérdida de la estructuración de la matriz extracelular (MEC) es una de las características primordiales (Zhou, 1997; Nakada, 2003; Yamasaki, 2004; Hussain, 2017). Una de estas patologías es la preeclampsia. Previo a la descripción fisiomolecular de la preeclampsia, nos enfocaremos en describir brevemente a las MMPs.

Las MMPs pertenecen a una familia de endopeptidasas zinc-dependientes que intervienen en los procesos fisiológicos de organogénesis, cicatrización, involución uterina, Así también, las MMPs están involucradas en diversas condiciones patológicas como la inflamación, enfermedades autoinmunes y carcinogénesis (Nagase, 2006; Page-McCaw, 2007) .

Se han descrito 25 miembros de la familia MMPs. Si bien cada una de ellas tiene un nombre descriptivo y un número, se ha propuesto clasificarlas en cinco subfamilias dependiendo de su función y estructura: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, MMPs de la membrana (MT-MMPs) y otras MMPs. Todas ellas difieren en su estructura y especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz de conducir a la degradación de la totalidad de los componentes macromoleculares de la MEC.

Aunque la primera función bien estudiada de las MMPs fue la degradación de la MEC, actualmente se considera que cumplen un papel importante en el

procesamiento de moléculas bioactivas, tales como factores de crecimiento, citoquinas, quemoquinas y receptores de superficie celular (Gill, 2008).

Debido a la capacidad que tienen las MMPs de intervenir en el desarrollo y destino de las células del organismo durante la embriogénesis, están sujetan a una estricta regulación. La actividad proteolítica de las MMPs se regula, principalmente, en tres niveles: transcripción, activación de la proenzima e inactivación por proteínas endógenas denominadas inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) (Bergman, 2003; Song, 2006; Clark, 2008; Vicent, 2015; Li, 2016).

Cabe destacar que las MMPs, al igual que otras proteasas, se sintetizan como zimógenos inactivos en estado latente. Existen diferentes mecanismos de activación de las MMPs, entre los cuales se incluyen la autocatálisis, la unión al ligando o la intervención de otras MMPs como las MT-MMPs, que cumplen un importante rol en la activación de MMP-2 (Imai,1996).

B) Preeclampsia

La preeclampsia es una complicación médica del embarazo y se asocia con hipertensión arterial, elevados niveles de proteína en la orina (proteinuria) y retención de líquidos (edemas). En ocasiones, puede estar acompañado por una restricción del crecimiento fetal o en casos severos, puede desembocar en una eclampsia con daño al endotelio materno, riñones e hígado. Es la enfermedad del embarazo más común y una de las más peligrosas, con riesgo de vida para la madre y el feto, por lo que debe diagnosticarse y tratarse rápidamente (Sibai, 2005).

Si bien la etiología de la preeclampsia aún no es clara, se cree que el factor de inicio sería la reducción de la perfusión uteroplacentaria, como resultado de una invasión anormal de las arteriolas espirales por el trofoblasto extravascular (Zhou, 1997; Zhou, 2002). Investigaciones recientes han detectado que las placentas de mujeres con preeclampsia expresan menores niveles de MMP-9, FKBP52, de antígeno linfocítico humano (HLA-G), de lactógeno placentario y de integrina $\alpha 1\beta 1$, en comparación con placentas de embarazos normales. Más aún, se determinó que

las células trofoblásticas se diferencian anormalmente a sincitio, formando células gigantes y perdiendo, en consecuencia, su poder de invasión (Zhou, 1997; Zhou, 2002). Con la intención de esclarecer el mecanismo que interviene en preeclampsia, se realizó un análisis de microarreglos de genes humanos a partir de bases de datos en línea. En base a esos estudios, se determinó que miembros de la subfamilia fos se presentan como genes candidatos claves en el desarrollo de esta complicación médica, promoviendo la invasión a partir de la regulación de las MMPs, la diferenciación y la remodelación del citoesqueleto (Acar, 2015; Zhao, 2017).

Fallas en la remodelación de las arteriolas uterinas desencadenan una persistente vasoconstricción y la liberación de fragmentos apoptóticos en el espacio intervelloso que, en su conjunto, favorecen una respuesta inflamatoria sistémica de la madre. El estrés oxidativo placentario y sistémico, altera la expresión génica. En efecto, altos niveles de EROs activan a factores de transcripción, tales como NF-kappaB y AP-1, lo que conlleva a diferentes facetas del cuadro inflamatorio. En tal sentido, se ha encontrado que elevados niveles de NF-kappaB correlacionan con bajos niveles de bcl-2 y valores aumentados de caspasa 3; en base a estas observaciones se cree que el incremento de la apoptosis trofoblástica, estaría inducido por NF-kappaB y por los bajos niveles de bcl-2 (Aban, 2014).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se describió en la Introducción, las proteínas FKBP51 y FKBP52 están implicadas en la regulación tanto del retrotransporte, como de la actividad transcripcional de factores nucleares de variada naturaleza. Los receptores de esteroides y el factor nuclear NF-kappaB constituyen dos claros ejemplos de factores de transcripción regulados por FKBP51 y FKBP52. En este contexto, surgieron los interrogantes que impulsaron este trabajo: ¿Es posible que las proteínas FKBP51 y FKBP52, regulen la actividad de otros factores de transcripción distintos a los anteriormente mencionados? ¿ La función biológica de estas FKBP51 y FKBP52 solo se circunscribe a participar en la reocalización subcelular de factores de transcripción o también pueden afectar otros niveles de sus cascadas de activación?.

Sobre la base de estos antecedentes, se abordó el estudio de la regulación de del factor de transcripción AP-1 mediada por FKBP51 y FKBP52. Este factor de transcripción es inducido rápidamente y se acumulan en forma transitoria, modulando la expresión de varios genes de respuesta temprana. Entre la variedad de genes blancos que regula tanto AP-1 y como NF-kappaB, encontramos a los genes que codifican para las MMPs y para la IL-6. Se ha demostrado previamente que tanto las MMPs como la IL-6 desempeñan un papel crítico durante los procesos de invasión trofoblástica y remodelación de la matriz extracelular (MEC) de la interfase materno-placentaria. Además, trabajos previos señalan que alteraciones en la expresión de FKBP52 se correlacionan con patologías placentarias, cuyos denominador común es la disfunción trofoblástica y una remodelación utero-placentaria deficiente.

Considerando que la remodelación de la MEC es crucial en distintas etapas del embarazo y que los miembros de AP-1, c-Fos y C-jun, participan activamente en este proceso, nos planteamos estudiar la regulación de la de activación de AP-1 mediada por proteínas FKBP51 y FKBP52 en células trofoblásticas.

En este contexto, postulamos como **hipótesis general de este trabajo que las FKBP51 y FKBP52 regulan la cascada de activación de AP-1.**

Con el fin de poner a prueba dicha hipótesis, planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo general

Caracterizar la regulación de AP-1 mediada por FKBP, particularmente sobre c-Fos y c-Jun, en células trofoblásticas BeWo.

Objetivos específicos

- I) Caracterizar el mecanismo de acción regulatorio de las FKBP sobre AP-1.
- II) Evaluar los efectos biológicos de la regulación de las FKBP sobre AP-1 y NF-kappaB.
- III) Analizar los efectos funcionales de compuestos naturales sobre la acción regulatoria de FKBP52 descrita para los factores de transcripción AP-1 y NF-kappaB.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales usados en la Tesis Doctoral

1.1. Bacterias

(a) Cepas

Para la producción de ADN plasmídico y la obtención de proteínas recombinantes, se utilizaron las cepas DH5 α y BL21 de *Escherichia coli*, respectivamente.

(b) Medios de crecimiento

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, el LB se suplementó con el antibiótico de selección correspondiente (ampicilina 100 μ g/ml o kanamicina 50 μ g/ml). Las bacterias se crioconservaron añadiendo glicerol 70 % v/v y se guardaron a -80°C.

1.2. Cultivos celulares

1.2.1. Líneas celulares

Tabla 1: Líneas celulares utilizadas en la Tesis Doctoral

Línea celular	Características/ Origen	Tipo celular	Medio cultivo
BeWo	Células de coriocarcinoma humano. Gentilmente cedida por la Dra. Cecilia Varone, UBA-FCEN/ IQUIBICEN.	Epitelial	DMEN / F12, SFB 10% v/v , Glutamax 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, antibióticos (penicilina 0.1 U/ml y estreptomycin 10 μ g/ml)

BeWo-Clon Control	Derivado de la línea celular BeWo transfectada en forma estable con el vector pCI-Neo, seleccionada por resistencia al antibiótico G418	Epitelial	DMEN/F12, SFB 10% v/v, Glutamax 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, G418 200 mM, antibióticos (penicilina 0.1 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml)
BeWo-Clones FKBP51 (clones 1,2,3)	Derivados de la línea celular BeWo transfectada en forma estable con el vector pCI-Neo-Flag-hFKBP51, seleccionada por resistencia al antibiótico G418	Epitelial	DMEN/F12, SFB 10% v/v , Glutamax 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, G418 200 mM, antibióticos (penicilina 0.1 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml)
HEK 293T	Células embrionarias del riñón humano que contiene el antígeno T del virus SV40	Embrionario	DMEM, SFB 10% v/v , antibióticos (penicilina 0.1 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml)

1.2.2. Cultivo de líneas celulares

Para el cultivo de células BeWo se utilizó el medio DMEN/F12 (1:1, Gibco) conteniendo SFB 10 % v/v (Internegocios S.A.) y una mezcla de antibióticos (penicilina 0.1 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml) suplementado con Glutamax (Gibco) 2 mM y piruvato de sodio (Invitrogen) 1 mM.

Para el cultivo de células HEK-293T, se empleó medio DMEM (Internegocios S.A.) suplementado con SFB 10 % v/v y antibióticos (penicilina 0.1 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml).

Ambas líneas celulares se incubaron en una atmósfera húmeda, a 37°C y con CO₂ al 5 %. En casos de manipulación de líneas celulares fuera de la estufa, se utilizaron cámaras de flujo laminar.

Las células BeWo y HEK-293T se cultivaron en placas o frascos de cultivo para células adherentes. El proceso de subcultivo se realizó lavando con PBS (1x, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄ 1.4 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM pH 7.4) y añadiendo una solución de EDTA-Tripsina 0.05 % v/v (Invitrogen). Tras una breve incubación a 37°C durante 2-5 min, se neutralizó la reacción de tripsinización añadiendo medio de cultivo fresco y realizando la dilución pertinente.

1.2.3. Preservación de líneas celulares

Para la preservación de líneas celulares, se prepararon crioviales con suspensiones celulares. Las células en suspensión, despegadas por la acción de la mezcla EDTA-Tripsina, se centrifugaron y se resuspendieron en una mezcla de SFB, conteniendo DMSO 10 % v/v. A continuación, los crioviales se enfriaron lentamente hasta una temperatura final de -80°C y luego, fueron transferidos a contenedores con nitrógeno líquido.

1.2.4. Descongelado de células

Las células contenidas en los crioviales se descongelaron en un baño de agua a 37°C y posteriormente, se lavaron con 5 volúmenes de medio de cultivo. Paso siguiente, las células se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en el medio de cultivo pertinente.

1.2.5. Conteo de células

El conteo de células se efectuó a partir de una mezcla isovolumétrica de suspensión celular y de azul tripán 0.4 % v/v en PBS. El azul de tripán es un colorante que permite evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, al ser incapaz de penetrar y teñir a las células vivas que cuentan con sus membranas íntegras.

Paso siguiente a la adición del colorante vital, las mezclas se introdujeron por capilaridad entre la cámara de Neubauer y el cubreobjeto.

El conteo se realizó con un microscopio óptico a un aumento de 40x, cuantificándose el número de células de cuatro cuadrantes de 1 mm² correspondientes a las esquinas de la retícula.

El número de células totales por ml se calculó según la siguiente fórmula:

$\text{Células/ml} = N \times 1/4 \times 10.000 \times 2$, donde N = número total de células de los cuatro cuadrantes.

1.2.6. Transfección

(a) Transfecciones transitorias

La línea celular BeWo se transfectó transitoriamente empleando el reactivo PEI. Se prepararon mezclas de plásmidos+PEI en medio DMEN/F12 carente de antibióticos y de SFB. Cada mezcla se homogenizó y se incubó por separado a temperatura ambiente (TA) durante 8 min. Transcurrido dicho tiempo, las mezclas se agregaron al medio de cultivo respectivo.

La línea celular HEK 293T se transfectó según el método de precipitación con fosfato de calcio. Una solución de CaCl₂ (0.25 M), conteniendo el ADN de interés, se adicionó con igual volumen de solución HBS 2x (HEPES 50 mM, Na₂HPO₄ 1.5

mM, NaCl 280 mM), se homogenizó por vortex y se incubó en hielo por 10 min. Luego, la mezcla de transfección se añadió al medio de cultivo celular.

Transcurridas 24 h de incubación en estufa, se removió la mezcla de transfección y se reemplazó por medio de cultivo fresco.

(b) Transfecciones estables

Para generar clones estables del vector vacío pCI-Neo o FKBP51, se sembraron células BeWo en placas de 96 pocillos a baja confluencia. Luego, las células se transfectaron con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 mediante el método de PEI y tras 24 h de post transfección, se inició el proceso de selección añadiendo al medio de cultivo el antibiótico G418, en una concentración final de 400 µg/ml. El medio con antibiótico fue reemplazado cada 3 días, desde la formación de colonias hasta su selección, durante 3 semanas. Una vez establecidos los clones estables, se efectuó un mantenimiento constante cada 7 días empleando el mismo antibiótico de selección a una concentración menor de 200 µg/ml.

Se analizaron los niveles de proteína FKBP51 de los clones estables por la técnica *Western Blot* (WB). Se identificaron como clones estables de FKBP51 a aquellas colonias de células que expresaban niveles significativamente mayores de proteína FKBP51 en comparación a las células BeWo salvajes.

1.2.7. Diseño de los tratamientos realizados en las líneas celulares

Los tratamientos realizados en cada experimento se detallan en la leyenda de las figuras correspondiente a la sección de resultados.

De manera general, las células BeWo se privaron de suero durante 24 h previas al estímulo. Este paso experimental permite partir de una condición basal de c-Fos no inducido por factores presentes en el SFB y analizar los efectos desencadenados por el estímulo o agente a evaluar.

El estímulo más vastamente utilizado en los ensayos de la tesis fue el éster de forbol PMA, siendo el tiempo de incubación variable en función del parámetro a analizar.

En algunos casos, se utilizó el tratamiento con FK506 y puromicina. Estas drogas se suplementaron 30 min previo al estímulo con PMA, de manera tal, de favorecer su ingreso a las células y desarrollar su acción biológica. Asimismo, en algunos ensayos experimentales, las células se preincubaron con distintos flavonoides durante 60 min.

1.3. Reactivos utilizados

1.3.1. Estímulos

(a) Activadores de la vía MAPK

Forbol-12- miristato-13-acetato (PMA, Sigma): La solución madre 200x se preparó resuspendiendo el liofilizado en DMSO. Se utilizó una concentración final de 100 ng/ml.

Hidroperóxido de ter-butilo (TBOOH, Sigma): Se utilizó a una concentración final de 50 μ M a partir de una solución madre 70 % v/v en agua.

Interleuquinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8, Roche Life Science): Las interleuquinas fueron resuspendidas en agua de ampolla (Roche), preparando las siguientes concentraciones madre: IL-1 β 25 ng/ μ l , IL-6 12 ng/ μ l y IL-8 118 ng/ μ l . Se utilizaron en un rango de concentración final de 1.5- 2.5 ng/ml.

(b) Inductor del operón lac

Isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG, Sigma): se utilizó como inductor artificial del operón lac, ya que es capaz de unirse al represor Lacl, pero no es un sustrato de la

enzima β -galactosidasa. Las inducciones se llevaron a cabo a una concentración final de 1 mM partiendo de una solución madre 1 M disuelta en agua estéril.

1.3.2. Inhibidores

Tacrolimus (FK506, Sigma): inhibidor farmacológico de la actividad PPIasa de las FKBP5. La solución madre 1000x fue resuspendida en DMSO. Se empleó a una concentración final de 1 μ M.

Puromicina (Sigma): Inhibidor de la síntesis proteica. Presenta similitud estructural a los aminoacil-ARNt provocando una terminación prematura de la cadena peptídica. Se utilizó a una concentración final de 1 μ g/ml a partir de una solución madre de 10 mM.

1.3.3. Flavonoides

En búsqueda de inhibidores potenciales de la actividad PPIasa de FKBP52, se ensayaron distintos flavonoides: catequina (C), epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG) y epigallocatequina galato (EGCG).

Los flavonoides fueron resuspendidos en una mezcla 20 % v/v metanol en agua a las siguientes concentraciones madre: C 20 mM, EC 5 mM, ECG 10 mM, EGCG 20 mM. Estos compuestos se emplearon en una concentración final de 5-50 μ M.

1.3.4. Antibiótico de selección

Para seleccionar las células establemente transfectadas, se empleó el antibiótico G418 (Gibco) a una concentración de 400 μ g/ml. Para el mantenimiento de las líneas establecidas, el antibiótico G418 se utilizó una concentración de 200 μ g/ml.

1.3.5. Anticuerpos

(a) Anticuerpos primarios:

Anticuerpos anti-quinasas: ERK 1/2, Santa Cruz Biotechnology (sc-292838); **p-ERK 1/2**, Santa Cruz Biotechnology (sc-7383)

Anticuerpos anti-factores de transcripción: c-FOS, Santa Cruz Biotechnology (sc-52 y sc-8047); **c-JUN**, Santa Cruz Biotechnology (sc- 1694).

Anticuerpos anti-chaperonas/ co-chaperonas: α/β -HSP90, Santa Cruz Biotechnology (sc-13119); **HSP70**, Abcam Trading Company (ab-5442); **FKBP52 (UP30)**, provisto por Dr. K.Leach (Pharmacia and Upjohn Inc.,Kalamazoo, MI); **FKBP51 (MDG19)**, obtenido por Dr. Galigniana y equipo de trabajo (UBA-FCEN-IQUIBICEN/IBYME); **FKBP51**, Affinity BioReagents (PA1-020).

Anticuerpos anti-proteínas codificadas por genes blancos de AP-1 y NF-kappaB: MMP-2, Cell signaling (87809); **MMP-9**, Cell signaling (13667)

Anticuerpos anti-proteínas utilizados como control de carga: β -TUBULINA, Santa Cruz Biotechnology (sc-5274); **GADPH**, Santa Cruz Biotechnology (sc-47724).

(b) Anticuerpos secundarios:

- Acoplados con fluoróforos:

Anti-IgG de conejo-fluoróforo excitable a 488 nm , Alexa Fluor, Molecular probes.

Anti-IgG de conejo-fluoróforo excitable a 568 nm, Alexa Fluor, Molecular probes.

Anti-IgG de ratón-fluoróforo excitable a 488 nm, Alexa Fluor, Molecular probes.

Anti-IgG de ratón-fluoróforo excitable a 568 nm , Alexa Fluor, Molecular probes.

- Acoplados con peroxidasa (HRP):

Anti-IgG de conejo-HRP, Jackson.

Anti-IgG de ratón-HRP, Jackson.

1.3.6. Otros reactivos

Proteína A-Sefarosa (Sigma): Para las co-inmunoprecipitaciones, se utilizó proteína-A Sefarosa 50 % p/v en PBS.

Metil tiazol tetrazolio (MTT, Sigma): Para los ensayos de viabilidad celular, se empleó MTT a una concentración final de 125 µg/ml.

Resina GSH-agarosa (Thermo Scientific): Para la purificación de las proteínas de fusión con la enzima GST, se utilizó resina GSH-agarosa 4 % v/v.

2. Manipulación de ADN

2.1. Plásmidos

pAP1-Luc: plásmido reportero que presenta la secuencia consenso de unión a AP-1 clonada río arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga (luc).

pNF-kappaB-Luc: plásmido reportero que presenta la secuencia consenso de unión a NF-kappaB río arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga.

pCEFL-beta-galactosidasa: derivado del vector pCEFL, contiene el gen de la β-galactosidasa. Utilizado como control de eficiencia de transfección para normalizar los datos de unidades arbitrarias obtenidas de la medición de la actividad luciferasa.

pCI-Neo: plásmido de expresión, construcción vacía (sin proteína codificante) bajo el promotor CMV; utilizado para compensar la cantidad de masa de ADN transfectada, con el mismo vector .

pCI-Neo-hFKBP52: plásmido de expresión en células eucariotas para la proteína humana FKBP52, brindado por el Dr. Marc Cox, Universidad de Texas, EEUU.

pCI-Neo-hFKBP52 F67Y: plásmido de expresión en células eucariotas para la proteína humana FKBP52 que cuenta con una mutación puntual en el dominio PPlasa. La mutación consiste en la sustitución de un aminoácido por otro: fenilalanina por tirosina, en posición 67. Aportado gentilmente por Dr. Marc Cox.

pCI-Neo-hFKBP52 F130Y: plásmido de expresión en células eucariotas para la proteína humana FKBP52 que cuenta con una mutación puntual en el dominio PPlasa. La mutación consiste en la sustitución de un aminoácido por otro: fenilalanina por tirosina, en posición 130. Aportado gentilmente por Dr. Marc Cox.

pCI-Neo-hFKBP52 K354A: plásmido de expresión en células eucariotas para la proteína humana FKBP52 que cuenta con una mutación puntual en el dominio TPR. La mutación consiste en la sustitución de un aminoácido por otro: lisina por alanina, en posición 354. Aportado gentilmente por Dr. Marc Cox.

pCI-Neo-Flag-hFKBP51: plásmido de expresión en células eucariotas para la proteína humana FKBP51 fusionado al péptido Flag (DYKDDDDK), brindado por el Dr. Marc Cox.

pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV: plásmido de expresión en células eucariotas para la proteína humana FKBP51 fusionado al péptido Flag, que presenta una doble mutación en el dominio PPlasa. La mutación consiste en la sustitución de dos aminoácidos por otros: fenilalanina por aspártico, en posición 67 y aspártico por valina, en posición 68. Aportado gentilmente por Dr. Marc Cox.

pCMV6-Flag-TPR: derivado del vector pCMV6, es un plásmido de expresión en células eucariotas del dominio TPR de la proteína PP5 fusionado al péptido Flag. Cedido por el Dr. Michel Chinkers, Universidad de South Alabama, EEUU.

pGEX-GST: plásmido de expresión en células procariontas de la proteína glutatión S-transferasa (GST).

pGEX-hFKBP52-GST: plásmido de expresión en células procariotas proteína humana FKBP52 fusionada a la proteína GST. Empleado para los ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA).

2.2. Preparación de bacterias competentes

Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α o BL21 se emplearon como fuentes de bacterias competentes.

A partir del glicerol stock, se realizó una estría en una placa de LB agar (agar 2 % p/v, triptona 1 % p/v, extracto de levadura 0.5 % p/v, NaCl 0.5% p/v) libre de antibiótico y se incubó a 37°C por 16 h. Al día siguiente, una colonia fue picada y crecida en 5 ml de medio SOB (triptona bacteriológica 2 % p/v, extracto de levadura 0.5 % p/v, NaCl 0.01 M, KCl 2.5 mM) sin antibiótico (pre-cultivo) a 37°C durante 16 h con agitación constante (200 rpm). Se realizó una dilución 1/100 de este pre-cultivo y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.3 a 600 nm (cultivo en fase exponencial). Luego de alcanzar esa DO, se centrifugó el cultivo a 3.000 x g a 4°C durante 10 min. Paso seguido, se resuspendió el precipitado resultante en una solución CCMB 80 (CaCl₂ 80 mM, MnCl₂ 20 mM) y se incubó a 4° C durante 20 min. A continuación, se cosecharon las bacterias por centrifugación en las mismas condiciones que el paso anterior y nuevamente, se resuspendió el precipitado en CCMB 80 frío. Luego de una incubación a 4°C durante 10 min, la suspensión bacteriana se fraccionó en alícuotas. Dichas alícuotas se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

2.3. Transformación de bacterias competentes

La transformación se realizó a partir de la incubación de una alícuota de 100 µl de bacterias competentes (*Escherichia coli* DH5α o BL21) y de 0.5-1 µg de plásmido de interés a 4° C durante 20 min. Seguidamente, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 90 s y las mezclas fueron colocadas, nuevamente, en hielo durante 5 min. La recuperación de las bacterias competentes se llevó a cabo adicionando 100 µl de medio de cultivo SOC (triptona 2 % p/v, extracto de levadura 0.5 % p/v, NaCl 0.05 % p/v, KCl 2.5 mM) e incubando a 37°C durante 1 h. La selección de las bacterias transformadas se implementó en un cultivo de medio sólido de LB Agar suplementado con el antibiótico correspondiente a la resistencia provista por el plásmido transformado. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h. En paralelo, se sembró una alícuota de bacterias transformadas en una placa sin antibiótico como control de viabilidad y otra alícuota en LB Agar suplementado con antibiótico como control de contaminación.

Las colonias obtenidas se repicaron en 5 ml de medio LB (triptona 1 % p/v, extracto de levadura 0.5 % p/v, NaCl 0.5 % p/v) con antibiótico y se incubaron a 37°C durante 16 h con agitación constante (200 rpm). A partir de estos cultivos, se purificó el ADN plasmídico en pequeña escala para identificar las colonias transformadas.

2.4. Purificación de ADN plasmídico

2.4.1. Preparación de ADN plasmídico a pequeña escala

El cultivo proveniente de cada colonia se centrifugó a 6.000 x g por 10 min y se resuspendió el precipitado resultante en 250 µl de solución de resuspensión (Tris/HCl 50 mM, EDTA 10 mM, ARNasa A 50 µg/ml). Luego, se adicionó 250 µl de

solución de lisis (NaOH 200 mM, SDS 1 % p/v) y seguidamente, se agregó 300 µl de solución de neutralización (acetato de potasio 2.55 M). Se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min para separar el ADN genómico que precipita mientras el ADN plásmido permanece en el sobrenadante. Por consiguiente, se transvasó el sobrenadante a un tubo limpio para la posterior precipitación del ADN plasmídico mediante el agregado de isopropanol. Se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se efectuó un lavado del ADN purificado mediante el agregado de 500 µl de etanol 70 % v/v. Finalmente se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min y se dejó secando el precipitado TA. El precipitado fue resuspendido en 20 µl de agua bidestilada.

2.4.2. Preparación de ADN plasmídico a mayor escala

Se inocularon 50 ml (MiniPrep) o 200 ml (MaxiPrep) de medio LB con bacterias *Escherichia coli* DH5α, previamente transformadas con el plásmido de interés, y se cultivaron a 37°C durante 16 h. A partir del mismo se purificó el ADN plasmídico empleando el kit comercial Wizard® Plus Midipreps o Maxipreps DNA Purification System (Promega, N° catálogo: A7640 o A7270, respectivamente) siguiendo el protocolo adjunto al mismo.

2.5. Cuantificación de ADN plasmídico

La concentración de ADN en cada muestra de plásmido, a ser utilizado posteriormente en transfecciones, se determinó por la lectura de su OD a 260 nm, consideran que para ADN 1 OD 260 equivale a 50 µg/L de ADN. Se tomaron 8 µl de cada muestra y se diluyeron en 800 µl de agua bidestilada. La absorbancia a 260 nm se determinó por espectrofotometría empleando el espectrofotómetro de cuba Biorad SmartSpec Plus. La misma fue corregida por la absorbancia a 280 nm

indicativa de la presencia de proteínas, verificando que la relación entre ambas mediciones fuera mayor a 1.8.

2.6. Electroforesis en gel de agarosa

El análisis del ADN plasmídico se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v en solución Tampón TAE (tris base 0.8 mM, acético glacial 0.1 % p/v, EDTA 2 μ M pH 8), a la cual se le agregó adicionalmente bromuro de etidio 0.5 μ g/ml.

Cada muestra se preparó por adición de solución de siembra para ADN (glicerol 30 % v/v, azul de bromofenol 0.25 % v/v). Las condiciones de la corrida electroforética fueron: voltaje constante (100 V) por 20 min. Se reveló la presencia de ADN plasmídico por exposición a luz UV en un transiluminador (GBOX Syngene), determinando así los clones positivos.

3. Ensayos de transactivación

Las interacciones proteína-ADN se detectaron indirectamente mediante ensayos de transactivación, empleando secuencias de ADN consenso de unión a FTs fusionados al gen de luciferasa. Estos ensayos permiten detectar la unión de proteínas a secuencias específicas del ADN, midiendo los niveles de expresión del gen luciferasa.

Las células HEK-293T o BeWo se sembraron en placas de 12 pocillos y luego de 24 h post siembra, se co-transfectaron con 0.5 o 1.5 μ g del plásmido reportero junto con 0.1 o 0.5 μ g del vector control de transfección pCEFL-beta-galactosidasa, respectivamente.

Transcurrido el período de inducción, se lavaron las células con PBS y se agregaron 50 a 100 μ l de tampón de lisis (tritón X-100 0.2 % v/v, K_2HPO_4 10 mM,

DTT 0.1mM) por pocillo, según la línea celular. Paso siguiente, los lisados celulares se congelaron a -80°C durante 20 min y transcurrido este tiempo, se descongelaron con el fin de favorecer la ruptura celular. Una vez descongelados, se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 5 min y se recuperaron los sobrenadantes sobre los que se ensayó la actividad enzimática.

3.1. Determinación de la actividad luciferasa y β -galactosidasa

La actividad de la enzima luciferasa se cuantificó utilizando el luminómetro Glomax MultiDetetion System. En una placa blanca de 96 pocillos, se sembraron 25 μl de cada una de las muestras, 36 μl de solución 1 (glicinglicina 25 mM, EGTA 4 mM, tritón x-100 0.27 % v/v, K_2HPO_4 15 mM, ATP 0.2 mM, DTT 1 mM) y 9 μl de solución 2 (glicilglicina 25 mM, EGTA 4 mM, DTT 2 mM, luciferina 0.1 mM).

La actividad enzimática de β -galactosidasa se midió utilizando el lector de microplaca RAYTO RT-6000. En una placa transparente de 96 pocillos, se incubaron 25 μl de cada muestra junto a 100 μl de una solución de revelado a TA hasta el desarrollo de color amarillo. La solución de revelado consiste en ONPG 1mg/ml disuelto en solución PM2 (Na_2HPO_4 460 mM, NaH_2PO_4 440 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, β -mercaptoetanol 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$). La absorbancia se midió a 415 nm.

La actividad transcripcional de AP-1 o NF-kappaB se calculó relativizando las unidades relativas de luciferasa (URL) con la actividad enzimática de β -galactosidasa obtenida para cada muestra con el objetivo de considerar la eficiencia de transfección en cada caso. A partir de estos valores, se restó primero el valor promedio registrado para las muestras controles (tampón de lisis sin lisados celulares) y luego, el valor correspondiente a las muestras basales (tampón de lisis con lisados de células no estimuladas).

La cantidad óptima de plásmido necesaria para una transfección eficiente (señal clara y repetible, significativamente diferente de los valores basales y libre de

saturaciones del sistema) se determinó mediante una curva de transfección con concentraciones crecientes del plásmido reportero pAP1-Luc. Así, en base a lo observado en la Figura 12, se decidió transfectar 0.5 µg o 1.5 µg de plásmido reportero en células HEK-293T o BeWo, respectivamente.

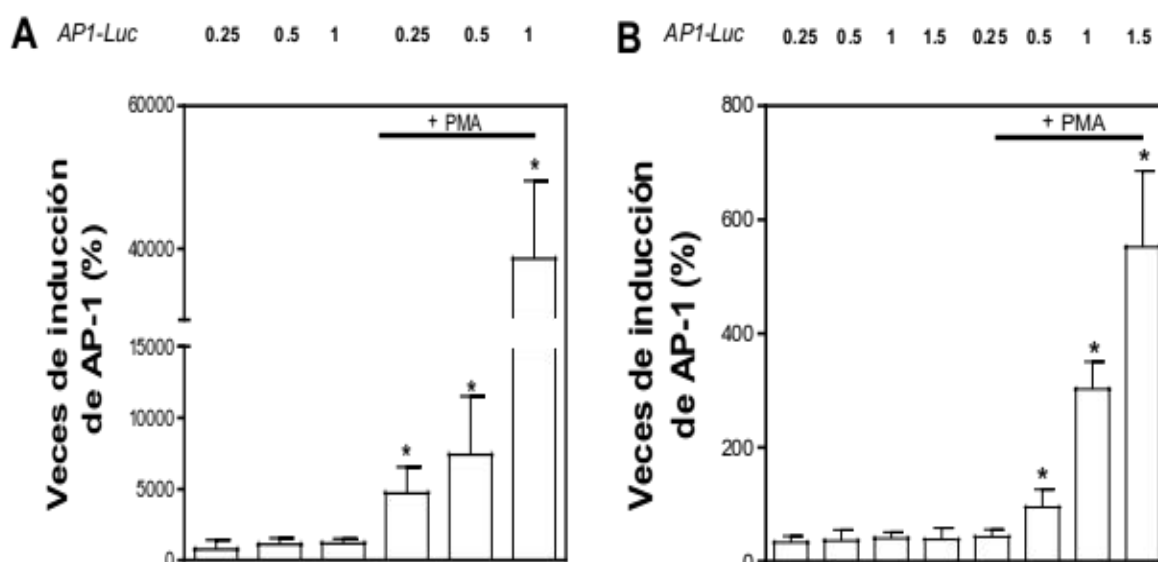


Figura 12. Ensayo de gen reportero de AP-1: actividad inducida por PMA

Células HEK-293T (A) y BeWo (B) se transfectaron transitoriamente con el plásmido pCEFL-beta-galactosidasa (0.15 o 0.5 µg, respectivamente) y cantidades crecientes de pAP1-Luc, sin o con estímulo (PMA 100 ng/ml). La actividad transcripcional fue evaluada mediante un ensayo de gen reportero. Éstos se expresan como porcentaje de las veces de inducción de AP-1 (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa, y normalizado al valor promedio del grupo basal correspondiente a cada cantidad de plásmido pAP1-Luc transfectada. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo basal correspondiente a cada cantidad de plásmido respectiva, determinadas por la prueba estadística de Anova de un factor ($p < 0.05$).

4. Análisis traduccional

4.1. Preparación de extractos celulares

La preparación de extractos celulares se realizó descartando el medio de cultivo y lavando dos veces con 1 ml de PBS frío cada uno de los pocillos de la placa. Las células se levantaron mecánicamente en 1 ml de PBS utilizando un rastrillo de

plástico y se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min. El precipitado celular se resuspendió en 50 µl de tampón de lisis (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.5mM, NP-40 1 % v/v, DTT 1mM más el agregado de un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas) y se congeló a -80°C durante 20 min. Seguidamente, las muestras se descongelaron y se sometieron a ciclos de vortex cada 5 min durante 30 min intercalados con períodos de incubación en hielo. Una vez lisadas, se centrifugaron a 15.000 x g a 4°C durante 30 min y el sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf.

Del volumen total de lisado de células, se separó una alícuota para la determinación de proteínas mediante el método de Bradford mientras que el resto se utilizó para el ensayo WB. A las muestras se les agregó solución tamponada de siembra 4x (Tris/HCl 250 mM, glicerol 20 % v/v, SDS 4 % v/v, β-mercaptoetanol 10% v/v y azul de bromofenol 0.25 % v/v) y se hirvió por 5 min.

Para estudios de fosforilación de c-Fos, previo al agregado de solución de siembra, se incubaron 30 µg de proteínas de cada muestra con 12 U de fosfatasa alcalina o volumen equivalente del vehículo a 37°C durante 30 min.

En algunos casos, se reservó el medio condicionado de las células para posteriores ensayos de zimografía y de ELISA. Para ello, se centrifugó el medio a 2.500 x g durante 5 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. Las muestras se guardaron a -80 °C.

4.2. Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se efectuó utilizando el método de Bradford (1976). Brevemente, se mezcla el extracto (provenientes de diluciones pertinentes en agua bidestilada) con 100 µl del reactivo de Bradford (brilliant blue G-250 0.01 % p/v, etanol 5 % v/v, ácido orto-fosfórico 10 % v/v). Se midió la absorbancia a 595 nm empleando el espectrofotómetro Glomax

MultiDetection System y se intrapolaron los valores en una curva estándar de BSA (0.2-1.4 µg/µl).

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

Para resolver las muestras obtenidas, se realizó una corrida electroforética en un gel de poliacrilamida desnaturalizante según el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), haciendo uso del sistema Mini-Protean III Electroforesis Cell (Bio-rad, Richmond, California, E.E.U.U.)

En función del peso molecular de las proteínas a evaluar, las muestras se resolvieron en geles de distinto porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 10 %, 12 % o 15 %, Tris/HCl 375 mM pH 8.7, SDS 0.1 % p/v) de 0.75 o 1.5 mm de espesor. Se sembraron de 30 a 50 µg de muestra, dependiendo de que se deseaba inmunodetectar.

Se utilizó una solución de corrida (1x, glicina 1.92 M, SDS 1 % p/v, Tris base 250 mM), ajustando el voltaje a un valor inicial de 80 V hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador (acrilamida/bisacrilamida 4 % p/v, Tris/HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0.1 % p/v). Posterior al compactamiento de las proteínas en el gel concentrador, se aumentó el voltaje a 120 V hasta alcanzar la resolución necesaria tomando como referencia el marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, de 10 a 180 kDa, Thermo Scientific).

4.4. Electrotransferencia de proteínas (*Western blot*) e

Inmunodetección de proteínas

Las proteínas resueltas se transfirieron desde el gel a una membrana PVDF de 9 x 4 cm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), previamente activada, mediante un equipo de transferencia semiseca Bio Rad, Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell.

La activación de las membranas PVDF se realizó humectándolas, en primer lugar, en metanol y luego, en solución de transferencia semiseca (glicina 39 mM, SDS 0.04 % p/v, tris base 48 mM, metanol 20 % v/v).

En cuanto a las condiciones puntuales de transferencia, el procedimiento se efectuó con voltaje constante (15 V) durante 1 h o 1.5 h, dependiendo del espesor del gel.

Luego de la transferencia, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (BSA 0.1 % p/v, tween-20 0.4 % v/v, EDTA 1 mM, azida sódica 2 % p/v, Tris/HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM) a TA durante 0.5 h con agitación constante y como paso siguiente, con el correspondiente anticuerpo primario a 4°C durante 16 h.

Para efectuar los lavados del anticuerpo primario, se realizaron 3 ciclos de lavado de 5 min con TBS-Tween.

Tras los lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario respectivo a TA durante 2 h y con agitación constante. Seguidamente, se efectuaron dos lavados de 10 min con TBS-Tween y un lavado con PBS.

Como último paso, se revelaron las membranas. El revelado de las membranas consistió en la incubación de las membranas en solución de revelado (Tris/HCl 40 mM pH 8.7, luminol 2.5 mM, ácido p-cumárico 0.4 mM, H₂O₂ 0.02 % v/v) y la adquisición de las imágenes pertinentes mediante el equipo de fluorescencia y quimioluminiscencia Amersham *Imager* 600 series.

La cuantificación de bandas por densitometría se realizó mediante el programa Image J (v.1.45) del NIH, de modo de normalizar los valores de densidad de píxeles

de las bandas de las proteínas de interés en función de la expresión de los controles de carga.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de WB

Proteína blanco	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (HRP)
c-Fos	Anti-c-Fos (conejo), policlonal, 1:1000	Anti- IgG conejo, 1:5000
c-Fos	Anti-c-Fos (ratón), monoclonal, 1:1000	Anti- IgG ratón, 1:2000
c-Jun	Anti-c-Jun (conejo), policlonal, 1:1000	Anti- IgG conejo, 1:5000
ERK	Anti-ERK (conejo), policlonal, 1:1000	Anti- IgG conejo, 1:5000
p-ERK	Anti-p-ERK (ratón), monoclonal, 1:500	Anti- IgG ratón, 1:2000
FKBP52	UP30, policlonal, 1:2000	Anti- IgG conejo, 1:5000
FKBP51	MDG19 (ratón), monoclonal, 1:500	Anti- IgG ratón, 1:2000
FKBP51	Anti-FKBP51 (conejo), monoclonal, 1:1000	Anti- IgG conejo, 1:5000
α/β -HSP90	Anti- α/β -HSP90 (ratón), monoclonal, 1:500	Anti- IgG ratón, 1:2000
HSP70	Anti-HSP70 (conejo), monoclonal, 1:1000	Anti- IgG conejo, 1:5000
MMP-2	Anti-MMP2 (conejo), monoclonal, 1:2000	Anti- IgG conejo, 1:5000

MMP-9	Anti-MMP2 (conejo), monoclonal, 1:2000	Anti- IgG conejo, 1:5000
GADPH	Anti-GADPH (ratón), monoclonal, 1:1000	Anti- IgG ratón, 1:2000
β -tubulina	Anti- β -tubulina (ratón), monoclonal, 1:1000	Anti- IgG ratón, 1:2000

4.6. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Luego del tratamiento correspondiente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA 3 % v/v en PBS a TA durante 30 min. Tras la fijación, se agregó glicina 1 % v/v en PBS con el fin de frenar el entrecruzamiento de proteínas promovido por PFA. Se realizaron dos lavados con PBS y las células se permeabilizaron mediante el uso de tween 0.1% v/v en PBS durante 5 min.

A continuación de la permeabilización, se realizaron nuevos lavados con PBS y se efectuó el bloqueo con la solución AFI (BSA 0.5 % v/v, tween-20 0.2 % v/v, azida sódica 0.1 % v/v, tris 50 mM pH 8).

El siguiente paso consistió en incubar los cubreobjetos con las células adheridas a una de sus caras con los anticuerpos primarios pertinentes en solución AFI a 4°C durante 16 h. Luego de tres lavados con PBS, se realizó un nuevo bloqueo con BSA 1 % v/v en PBS de 20 min y seguidamente, la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados con un fluoróforo en solución BSA 1 % v/v de bloqueo a 37°C durante 1.5 h.

Por último se implementó una tinción nuclear incubando los cubreobjetos durante 15 min con una solución 1 mg/ml de DAPI en PBS. Tras tres lavados con PBS, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Mowiol.

Las preparaciones de inmunofluorescencia indirecta se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 empleando un objetivo de inmersión 60x. Para los distintos fluorocromos se usaron los cubos correspondientes.

El análisis de imágenes se realizó con el programa informático Image (v.1.45) cuantificando alrededor de 50-100 células por condición.

En base a una escala arbitraria de distribución subcelular de c-Fos, se contabilizaron como positivas aquellas células que correspondieran a la categoría 4.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en los ensayos de IF

Proteína blanco	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
c-Fos	Anti-c-Fos (conejo), policlonal, 1:50	Anti-IgG conejo - Alexa 488 nm, 1:1000
c-Fos	Anti-c-Fos (ratón), monoclonal, 1:50	Anti-IgG ratón - Alexa 568 nm, 1:500
FKBP52	UP30, policlonal, 1:100	Anti-IgG conejo - Alexa 488 nm, 1:1000
FKBP51	MDG19 (ratón), monoclonal, 1:50	Anti-IgG ratón - Alexa 568 nm, 1:500
FKBP51	Anti-FKBP51 (conejo), monoclonal, 1:100	Anti- IgG conejo - Alexa 488 nm, 1:1000

4.7. Co-Inmunoprecipitación

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro. Alcanzada una confluencia del 70 %, se deprivaron de suero por 24 h y se indujeron con PMA 100 ng/ml durante 1.5 h.

Las placas se lavaron dos veces con PBS frío y se cosecharon las células utilizando un rastrillo plástico. Seguidamente, se centrifugaron a 2.500 x g a 4°C durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución de lisis para inmunoprecipitaciones (Na₂MoO₄ 20 mM, EDTA 1 mM, HEPES 10mM pH 7.4). Se utilizó un homogenizador manual (tipo Dounce) para favorecer la ruptura celular. El homogenato se centrifugó a 12.000 x g a 4°C durante 10 min y el sobrenadante resultante se fraccionó en tres alícuotas: *INPUT*, fracción inmune (I) y fracción no inmune (NI).

Las muestras correspondientes a la inmunoprecipitación específica (I) se suplementaron con 200 ng del anticuerpo de interés; mientras que al control no específico (NI) se le adicionó 200 ng IgG de ratón .

Asimismo, junto con el anticuerpo o IgG de ratón, se agregó una solución de proteína A-Sefarosa 50 % p/v en PBS (Sigma), ambas fracciones (I y NI) se incubaron a 4°C durante 3 h con rotación constante. Luego se realizaron a 3 ciclos de centrifugaciones y lavados con la solución lisis para inmunoprecipitación.

Finalmente, al precipitado y al *INPUT*, se le agregó una solución tamponada de siembra 2x (Tris/HCl 125 mM, glicerol 10 % v/v, SDS 2 % v/v, β-mercaptoetanol 5 % v/v, azul de bromofenol 0.25 % v/v) o 4x (Tris/HCl 250 mM, glicerol 20 % v/v, SDS 4 % v/v, β-mercaptoetanol 10 % v/v, azul de bromofenol 0.25 % v/v) para proteínas, respectivamente. Dichas muestras se calentaron a 100°C por 5 min.

4.8. Fraccionamiento subcelular

Las células BeWo fueron crecidas en placas de 10 cm. Al llegar a confluencia, se estimularon y se lavaron 2 veces con PBS frío. Luego, se removieron de la superficie de la placa mediante la acción mecánica de rastrillos y se homogeneizaron en una solución de lisis A (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, igepal 0.1 % v/v, cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa) efectuando con la pipeta automática, 20 subidas y bajadas con la pipeta automática. Paso siguiente, el homogenato celular se centrifugó a 15.000 x g por 2 min. A partir

del sobrenadante, se obtuvo la fracción citosólica y el precipitado se resuspendió en una solución B (HEPES 10mM, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 420 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, glicerol 50 % v/v, cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa). Luego de una incubación de 20 min con ciclos de agitación intercalados, se centrifugó a 10.000 x g por 15 min. Del sobrenadante resultante, se obtuvo la fracción nuclear.

4.9. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

La actividad de unión de AP-1 a su secuencia consenso de ADN fue evaluada por la técnica de EMSA utilizando algunos de los reactivos del kit *LightShift Chemiluminescent* (Thermo Scientific). Se emplearon fracciones nucleares procedentes de cultivos celulares expuestos a distintos tratamientos previos.

La sonda consenso de AP-1 se biotiniló en su extremo 3' terminal mediante la acción de la enzima Tdt y se purificó mediante el empleo de la mezcla cloroformo:isoamílico (24:1).

Para la reacción de interacción ADN-proteína, las fracciones nucleares se preincubaron a 4°C durante 10 min con la solución de unión (Tris/HCl 10mM pH 7.5, glicerol 20 % v/v, MgCl₂ 1M, EDTA 0.5 mM, DTT 0.5 mM, NaCl 50 mM, poly (dI-dC) 0.05 mg/ml). Luego, 25 fmoles de sonda marcada fueron adicionados a las mezclas de reacción y se incubaron a TA durante 20 min. Para ensayos de "super-shift", se realizó una preincubación de las fracciones nucleares con anticuerpos o proteínas purificadas a 4°C durante 1 h .

Las muestras se resolvieron en geles de 6 % de acrilamida/bisacrilamida empleando el tampón de corrida TBE 0.5 x (tris 40 mM, H₃BO₃ 40 mM , EDTA 1mM) durante 2.5 h a 150 V y a una temperatura de 0°C. Una vez finalizada la corrida, se efectuó una transferencia semiseca (15 V, 400 mA) a una membrana de alta afinidad por ácidos nucleicos (Hybond N+ membrane) y seguidamente, se fijó físicamente el ADN a la membrana por radiación UV. El revelado se realizó incubando la membrana con streptavidina-peroxidasa en solución de bloqueo (SDS

5 % v/v, NaCl 0.125 M, Na₂HPO₄ 2 mM, NaH₂PO₄ 1 mM) y luego de varios lavados, la membrana se escaneó utilizando el equipo Amersham *Imager* 600 series.

4.10. Ensayos de zimografía

El presente protocolo fue adaptado de Fontana y colaboradores (2012). Las células BeWo salvaje o clones estables (vector control, FKBP51) fueron sembradas en placa de 6 pocillos a una densidad de 8×10^4 células. Transcurridos 24 h post-siembra, dependiendo del caso, las células BeWo salvaje se transfectaron transitoriamente. Alcanzado el 70-80 % de confluencia, se removió el medio de cultivo y se agregó medio DMEN/ F12 libre de suero. Acto seguido, se realizó una inducción con PMA a una concentración final de 100 ng/ml, durante 24 h o 48 h. Transcurrido este tiempo, se recolectó el medio condicionado y se centrifugó a $2.500 \times g$ durante 5 min para eliminar las células en suspensión. A continuación, se adicionó al medio condicionado una solución de siembra 4x (Tris/HCl 250 mM, glicerol 20 % v/v, SDS 4 % v/v, azul de bromofenol 0.25 % v/v).

La cantidad de medio condicionado sembrado se determinó en función de la cuantificación de proteínas totales de los lisados celulares por el método de Bradford.

Las proteínas de las muestras se resolvieron realizando una corrida electroforética en gel de poliacrilamida desnaturalizante co-polimerizado con gelatina (acrilamida/bisacrilamida 10 % p/v, gelatina 0.1 % p/v, Tris/HCl 375 mM pH 8.7, SDS 0.1 % p/v), de 0.75 mm de espesor. Las condiciones de la corrida fueron: voltaje constante a 80 V hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador (acrilamida/bisacrilamida 4 % p/v, Tris/HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0.1 % p/v), seguido de un voltaje a 100 V hasta alcanzar la resolución necesaria. La corrida se llevó a cabo en solución de corrida (glicina 1.92 M, SDS 1 %, tris base 0.25 M).

Una vez finalizada la corrida, los geles se lavaron en primera instancia con una solución de tritón X-100 2.5 % v/v en 2 ciclos de 30 min cada uno, y posteriormente, con solución de recuperación (Tris/HCl 50 mM pH 7.5, CaCl₂ 30 mM, NaCl 0.15 mM) dos veces durante 30 min. La porción de gel con el marcador de peso molecular fue reservada en la solución decolorante (metanol 30 % v/v, ácido acético 10 % v/v) durante 20 min y luego, pasada a agua bidestilada.

Se utilizó la misma solución de recuperación para incubar los geles a 37°C durante 18 h, teniendo la cautela de contar con un control negativo de MMPs. Para ello, se agregó un quelante de cationes divalentes (EDTA 40 mM) al medio de incubación de uno de los geles de la dupla.

El revelado de los geles se efectuó mediante una solución de tinción (azul de Coomassie brillante R-250 0.5 % p/v, metanol 30 % v/v, ácido acético 10 % v/v) a TA durante 30 min. Una vez teñidos, se destiñeron para hacer visibles las bandas de degradación mediante dos lavados de 20 min con solución decolorante. Para una mayor definición de las bandas, se dejó reposar los geles en agua bidestilada. La imagen se obtuvo utilizando el equipo Amersham *Imager* 600 series y las bandas de degradación de gelatina se cuantificaron utilizando el programa informático Image J (v.1.45) del NIH.

4.11. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Dependiendo del estímulo utilizado, las células BeWo fueron sembradas en placas de 6 o 24 pocillos, a una densidad de 8×10^4 o 3×10^3 células por pocillo, respectivamente.

Para la obtención y procesamiento del medio condicionado, se implementó el mismo protocolo del ensayo de zimografía. La concentración de IL-6 en el medio condicionado fue determinada mediante un producto comercial de ELISA (Roche Life Science). Siguiendo el protocolo, indicado por los proveedores, se agregó la

solución de lavado (PBS 1x, tween-20 0.05 % v/v) y seguidamente la solución de bloqueo (PBS 1x, SFB 10 % v/v pH 7) a los pocillos de la placa ELISA durante 1 h a TA. Se efectuaron nuevos lavados, y se incubaron las diluciones seriadas de los estándares de interleuquinas y las muestras diluidas en solución de bloqueo durante 1 h a TA. Tras los lavados, se agregó la solución de bloqueo con anticuerpos de detección y estreptovidina-HRP. Tiempo después, se añadió la solución sustrato (tampón citrato-fosfato pH 5, OPD 1 mg/ml, H₂O₂ 0.025 % v/v) y se incubó en la oscuridad hasta el desarrollo de color amarillo pardo. La reacción se frenó con H₂SO₄ 2N y la absorbancia se midió a 490 nm.

Los resultados obtenidos fueron normalizados por la cantidad de proteína total en cada pocillo.

4.12. Purificación de FKBP52-GST

La purificación de la proteína GST y hFKBP52-GST se efectuó partiendo de cultivos de bacterias *Escherichia coli* BL21 transformadas con los plásmidos pGEX-GST o pGEX-hFKBP52-GST, cuya DO a 600 nm se encontraba entre 0.4 y 0.6. Dichos cultivos fueron inducidos por incubación con IPTG a una concentración final de 1 mM a 37°C durante 4 h con agitación constante (200 rpm). Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10.000 x g a 4 °C durante 5 min y el precipitado resultante se resuspendió en solución de lisis HKE (HEPES 50 mM pH 7.5, acetato de sodio 10 mM, EDTA 1mM) seguido de 5 ciclos de sonicado de una duración de 20 s intercalados con períodos de reposo. Todo el proceso fue realizado en hielo. El sobrenadante, obtenido por centrifugación a 10.000 x g a 4°C durante 15 min, fue incubado con resina GSH-agarosa a 4°C durante 2 h con rotación constante. Transcurrido dicho tiempo, la resina se recuperó por centrifugación a 5.000 x g durante 5 min. Se efectuaron dos ciclos de lavados de 30 min con una solución que contenía HEPES 10mM y NaCl 1M; acto seguido, la astringencia de los lavados se incrementó, implementando 4 ciclos de 10 min con la solución de lisis HKE. La

elución de la proteína FKBP52-GST se realizó por incubación con la solución de elución (glutación 25 mM pH 8, HEPES 5 mM).

5. Evaluación de viabilidad celular

Este protocolo está basado en el ensayo de proliferación celular descrito por Scudiero (1988) y Silvester (2011).

Las células HEK-293T y BeWo fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 o 8×10^4 células por pocillo, respectivamente. Posterior a la siembra, las células fueron tratadas con los compuestos a evaluar durante un lapso de tiempo dependiente de la línea celular y las drogas ensayadas.

Para determinar la viabilidad celular, las células se incubaron con MTT a una concentración final de 125 $\mu\text{g/ml}$ a 37° C durante 1 h. Luego de remover el medio de cultivo, se resuspendió el colorante en 100 μl de DMSO por pocillo. Se midió la absorbancia a 562 nm y 630 nm, empleando el lector de microplaca RAYTO RT-6000.

Para el análisis de datos, se restó el valor de absorbancia de 630 nm y luego, se normalizaron los datos al valor promedio de absorbancia del grupo de células tratadas con el vehículo (a las cuales se le asignó el valor arbitrario del 100 %).

Las células BeWo o clones estables fueron sembrados en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células por pocillo. Posterior a la siembra, las células BeWo fueron transfectadas en forma transitoria utilizando el reactivo PEI y tras 24 h, se privaron de suero. Al día siguiente, se repuso medio de cultivo completo. Luego de 72 h en condiciones óptimas de cultivo, se efectuó el conteo de células por el método de exclusión de captación del azul de tripán 0.4 % v/v o recuento de células viables.

6. Evaluación del crecimiento celular a largo plazo: Ensayo de colonias

Para obtener colonias aisladas, se sembraron placas de 6 pocillos a una densidad de 2×10^2 células por pocillo. Tras 10 días de cultivo en condiciones óptimas, las colonias se contrastaron por coloración con azul violeta 0.1 % v/v. Las imágenes se obtuvieron utilizando el equipo Amersham *Imager* 600 series y las colonias se cuantificaron utilizando el programa informático Image J (v.1.45) del NIH.

Este ensayo se realizó para los clones de expresión estable obtenidos como se explicó en el punto 2.4 de la sección Resultados.

7. Análisis bioinformático del acoplamiento molecular de FKBP52 - ligando

El análisis de la unión in silico de FKBP52-ligando se realizó mediante el uso de dos estructuras tridimensionales del dominio FK1 y FK2 de FKBP52 libre (PDB: 1Q1C) o unida a FK506 (PDB:4LAX).

Las estructuras químicas de los ligandos EGCG y FK506 se dibujaron con el programa Marvin Sketch

Para la determinación de las coordenadas de la grilla de unión del complejo, se ubicaron espacialmente los residuos aminoácidos reportados como claves para la configuración estructural y funcional del dominio PPIasa empleando la aplicación Autodock Mgltools.

Las energías de unión de los complejos FKBP52-ligando fueron calculados y ordenados de menor a mayor por la aplicación AutodockVina.

8. Análisis de datos y procesamiento estadístico

Los datos cuantitativos se expresan como el promedio de cada valor acompañado de la desviación estándar, según se indica en cada experimento concreto.

Los resultados fueron analizados por la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores empleando el programa Graphpad Prism 6.1 seguido por la prueba de Turkey para examinar diferencias entre grupos. Se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas cuando se obtuvo un $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Mecanismo de acción regulatoria de las FKBP5s sobre AP-1.

CAPÍTULO 2: Efectos biológicos de la regulación de las FKBP5s sobre AP-1 y NF-kappaB.

CAPÍTULO 3: Efectos funcionales de EGCG sobre la acción regulatoria de FKBP52 descrita para los factores de transcripción AP-1 y NF-kappaB.

1. Mecanismo de acción regulatoria de las FKBP's sobre AP-1

1.1. Estudio de la fosforilación de las quinasas ERK y JNK mediado por las FKBP's

En virtud de preservar la homeóstasis, las células de un organismo son capaces de responder a cambios físicos y químicos del ambiente que las rodea (Risco y Cuenda, 2012). Para poder responder a estos cambios, una de las vías de transducción de señales más amplia, presente en células eucariotas, es la vía de la familia de las MAPKs. Como previamente se ha mencionado en la Introducción, esta familia de Ser-Thr quinasas pueden ser activadas por un gran número de estímulos extracelulares, tales como radiación ionizante, presencia de EROs, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, entre otros. La activación de las MAPKs regula, en último término, la transcripción de genes, síntesis de proteínas, maquinaria del ciclo celular, metabolismo celular y muerte celular.

Las MAPKs de la subfamilia ERK, ERK 1 y ERK 2, presentan un alto grado de homología y se expresan ubicuamente en mamíferos (Boulton y Cobb, 1991). En estado basal, ambas quinasas se localizan principalmente en el citoplasma y se activan por fosforilación frente a estímulos mitogénicos y factores de crecimiento. Una vez activadas, translocan al núcleo donde actúan sobre sus proteínas sustratos tales como los factores de transcripción Elk-1, c-Fos y Ets 1/2 (Seger, 2006).

Las JNKs forman parte de otra subfamilia de MAPKs. Cuentan con tres isoformas, entre las cuales JNK 1 y JNK 2 se distribuyen de forma ubicua y JNK 3 aparece preferentemente en cerebro (Chen, 2001). Está reportado que estas quinasas se activan fundamentalmente en respuesta a estímulos de estrés

celular como choque térmico o daños del ADN, citoquinas pro-inflamatorias e irradiación (Junttila, 2008). Sus sustratos clásicos son factores de transcripción como c-Jun y proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 y Bcl-xL (Raman, 2007).

Entre la variedad de estímulos extracelulares que inducen a la vía de las MAPKs, utilizaremos al éster de forbol PMA como estímulo central de los ensayos. Se sabe que el PMA media la fosforilación tanto de ERK como JNK a través de un mecanismo dependiente de la quinasa receptora de agentes promotores de tumores, PKC (Ueda, 1996; Lewis, 1998; Lopez-Bergami, 2008).

Con el objetivo de estudiar la modulación de las FKBP52 sobre la señalización de las de MAPKs, se caracterizó la fosforilación de ERK 1/2 por ensayos de WB. La estrategia que se adoptó para tal fin consistió en evaluar los niveles de proteínas de p-ERK y ERK 1/2 a distintos tiempos de inducción con PMA (100 ng/ml). Si bien está documentado que, tratamientos cortos con ésteres de forbol generan una rápida inducción de ERK en la mayoría de tipos celulares, haremos foco en tiempos más prolongados con la intención de analizar si FKBP52 modifican el patrón tardío de activación de ERK (Hoshi, 1989).

Paralelamente, nos interesó determinar si los efectos observados de las FKBP52 sobre la quinasa ERK podrían ser el resultado de la contribución funcional de su dominio PPIasa. Para resolver estos interrogantes, realizamos transfecciones de mutantes puntuales del dominio PPIasa de las FKBP52 que presentan la particularidad de carecer de actividad PPIasa.

Centrándonos, en primera instancia, sobre los efectos de FKBP52 a nivel de la fosforilación de ERK, observamos que esta INM incrementa los niveles de ERK 1/2 fosforilado durante un intervalo de tiempo mayor a 90 min, en comparación al grupo control. En contraste, al sobreexpresar la mutante puntual de FKBP52 (FKBP52 F130Y) se pierde el aumento sostenido de la fosforilación de ERK mediado por FKBP52 salvaje (Figura 13). Estas observaciones nos sugieren que podría existir una regulación postraducciona de ERK via FKBP52, que sería dependiente de la actividad enzimática del dominio PPIasa.

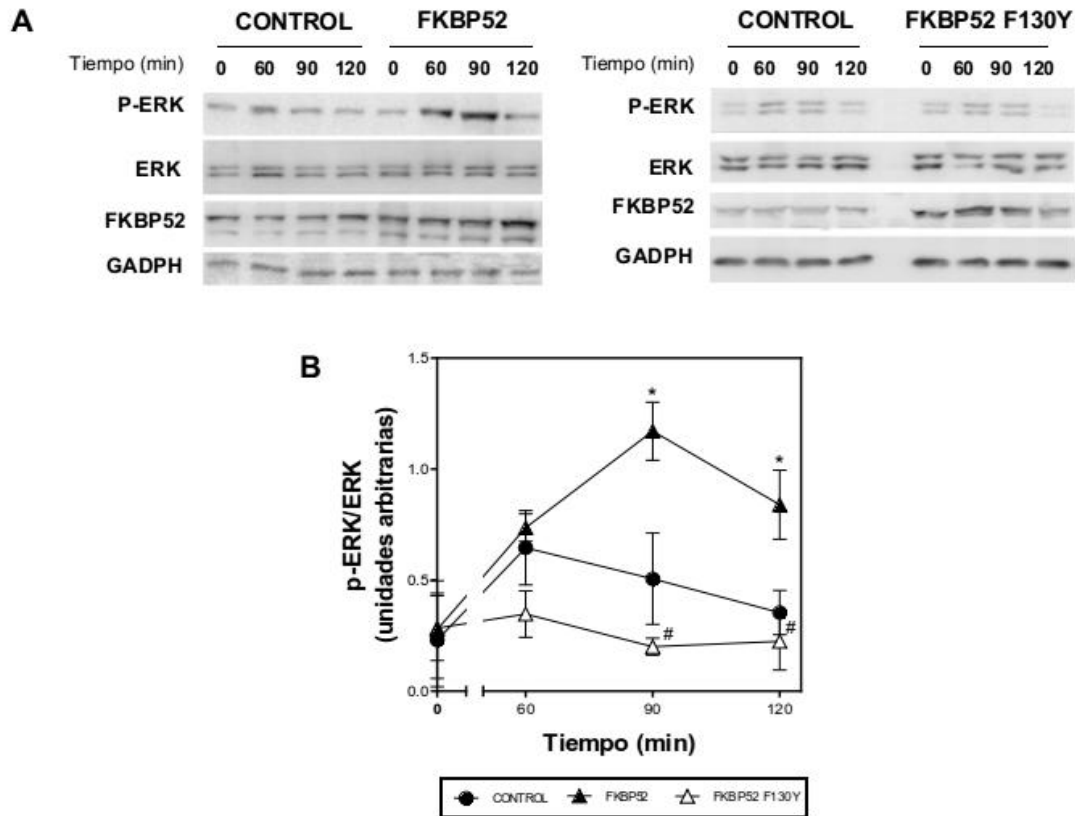


Figura 13. Efectos de FKBP52 sobre la fosforilación de ERK 1/2

A. Análisis de los niveles de ERK 1/2 y p-ERK 1/2 en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro), pCI-Neo-hFKBP52 (grupo FKBP52, puntuación: triángulo negro) o pCI-Neo-hFKBP52 F130Y (grupo FKBP52 F130Y, puntuación: triángulo blanco). Tras 24 h de privación de suero, las células se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-120 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como el cociente de p-ERK/ERK 1/2 a lo largo del tiempo ensayado (promedio \pm desvío estándar). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control a un tiempo dado mientras que el numeral (#) toma como parámetro al grupo FKBP52.

Con el fin de corroborar la intervención del dominio PPlasa de FKBP52 sobre la activación de ERK 1/2 empleamos la droga FK506 (1 μ M). Este agente farmacológico es capaz de unirse al sitio activo del dominio PPlasa de las FKBP, bloqueando estéricamente la unión al sustrato e inhibiendo, en consecuencia, su actividad enzimática.

La Figura 14 muestra los efectos de FKBP52 sobre la fosforilación de ERK en presencia de FK506. En similitud con los efectos de la mutante de FKBP52

F130Y, el pretratamiento con FK506 provocó una inhibición de la fosforilación de ERK mediada por FKBP52.

Estos resultados nos confirman que la actividad enzimática del dominio PPlasa de FKBP52 tendría un rol activo sobre la fosforilación de la quinasa ERK.

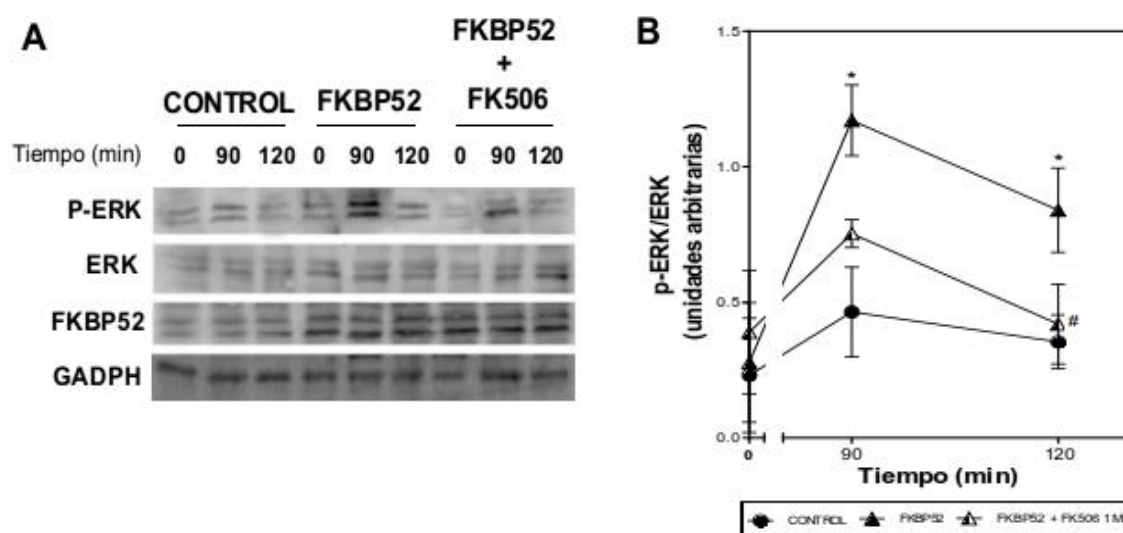


Figura 14. Efectos de FKBP52 sobre la fosforilación de ERK 1/2, en presencia del inhibidor FK506

A. Análisis de los niveles de ERK 1/2 y p-ERK 1/2 en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro) o pCI-Neo-hFKBP52 (grupo FKBP52, puntuación: triángulo negro). Tras 24 h de privación de suero, las células se preincubaron, en algunos casos con FK506 (grupo FKBP52 + FK506, 1 μM, puntuación: triángulo blanco y negro), y luego se trataron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-120 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como el cociente de p-ERK/ERK 1/2 a lo largo del tiempo ensayado (promedio ± desvío estándar). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control a un tiempo dado mientras que el numeral (#) toma como parámetro al grupo FKBP52, sin pretratamiento con FK506.

Por otro lado, cuando se analizaron los efectos de FKBP51 sobre la fosforilación de ERK no se obtuvieron diferencias significativas con el grupo control siendo este proceso independiente de la actividad enzimática del dominio PPlasa de esta INM (Figura 15).

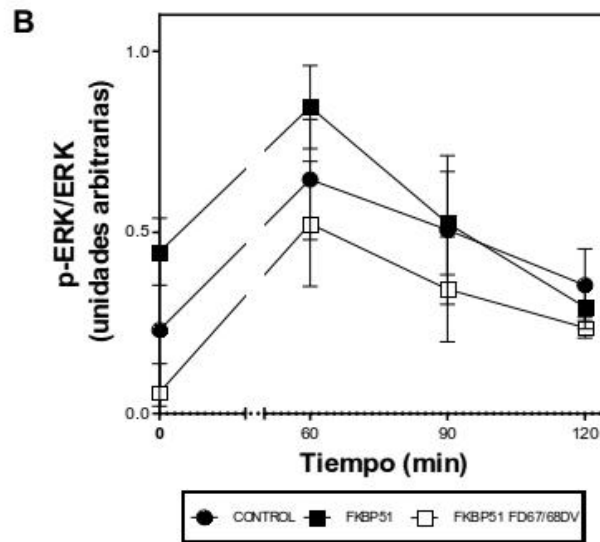
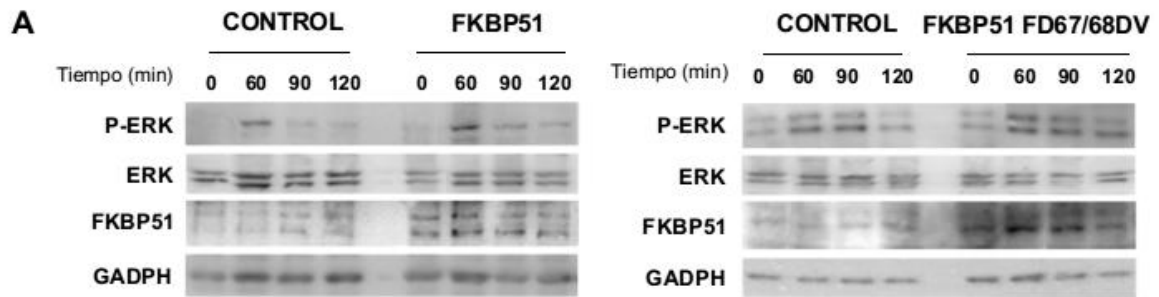


Figura 15. Efectos de FKBP51 sobre la fosforilación de ERK 1/2

A. Análisis de los niveles de ERK 1/2 y p-ERK 1/2 en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro), pCI-Neo-Flag-hFKBP51 (grupo FKBP51, puntuación: cuadrado negro) o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV (grupo FKBP51 FD67/68DV, puntuación: cuadrado blanco). Tras 24 h de privación de suero, las células se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-120 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como el cociente de p-ERK/ERK 1/2 a lo largo del tiempo ensayado (promedio \pm desvío estándar). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

De forma similar al efecto de FKBP52 sobre la activación de ERK, se detectó un efecto positivo esta INM sobre la fosforilación de JNK, prolongando su estado fosforilado por más tiempo que el control (Figura 16).

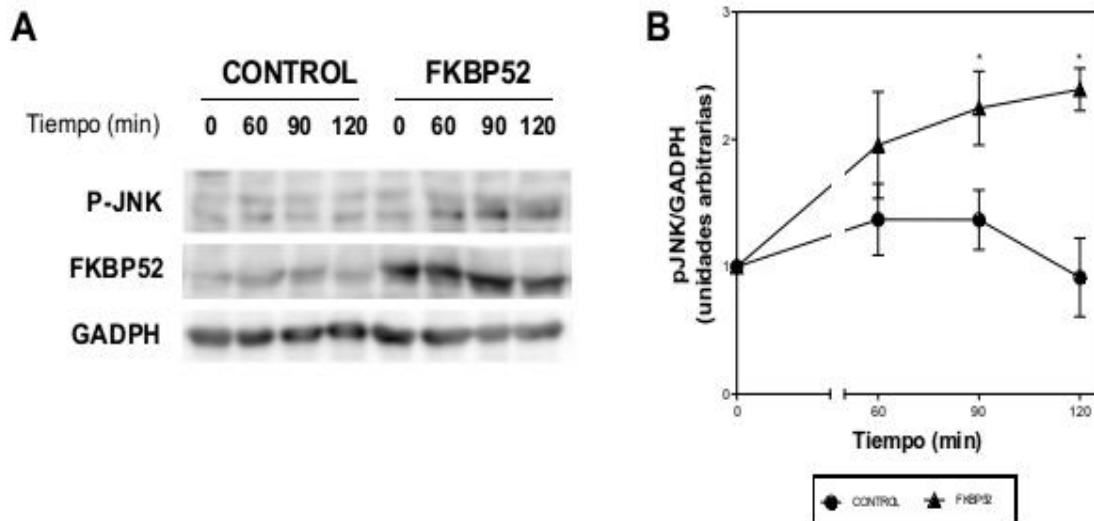


Figura 16. Efectos de las FKBP5s sobre la fosforilación de JNK

A. Análisis de los niveles de p-JNK en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro) o pCI-Neo-hFKBP52 (grupo FKBP52, puntuación: triángulo negro). Tras 24 h de privación de suero, las células se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-120 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como el cociente de p-JNK/GADPH a lo largo del tiempo ensayado (promedio \pm desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial de cada condición. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control para un tiempo dado, determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

Los resultados hasta aquí presentados indican que FKBP52 prolonga temporalmente la activación de ERK e incrementa los valores de p-JNK. El efecto de FKBP52 sobre los niveles de p-ERK es dependiente de la actividad enzimática de su dominio PPIasa. Por otro lado, no se detectó un efecto significativo de FKBP51, distinto del grupo control, sobre la fosforilación de ERK.

Considerando que ERK y JNK son las quinasas responsables de fosforilar a c-Fos y c-Jun respectivamente, y esto representa el primer paso en activación de estos FTs, podríamos especular que FKBP52 también tendría un papel importante en pasos subsecuentes, como ser la estabilidad, localización subcelular y actividad biológica de ambos FTs (Hunter, 1992; Hill, 1995; Karin, 1995; Monje, 2003).

1.2. Modulación de los niveles proteicos de c-Fos

El factor de transcripción c-Fos está codificado por un IEG. Estos tipos de genes se inducen con rapidez y en forma transitoria, como respuesta a una vairedad de estímulos celulares. La proteína c-Fos es una proteína inestable que una vez sintetizada se acumula en forma transitoria.

Por ensayo de WB, encontramos que la máxima cantidad de proteína total de c-Fos se alcanza a los 90 min posteriores a la inducción con PMA (Figura 17).

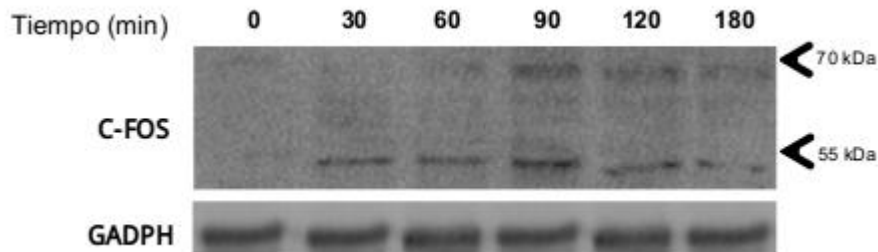


Figura 17. Los niveles de proteína c-Fos aumentan por inducción con PMA

Análisis de los niveles totales de la proteína c-Fos en células BeWo inducidas con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-180 min. Las flechas del borde derecho de la figura señalan el peso molecular de las bandas correspondientes a la proteína c-Fos.

Paso siguiente, se procedió a comparar los niveles totales de c-Fos entre el grupo control y aquel que sobreexpresaba FKBP52, a los 90 min posteriores a la inducción con PMA. El análisis de datos por WB demostró que altos niveles de FKBP52 se corresponden con altos niveles de c-Fos, significativamente mayores al grupo control y que dicho efecto es estímulo dependiente (Figura 18).

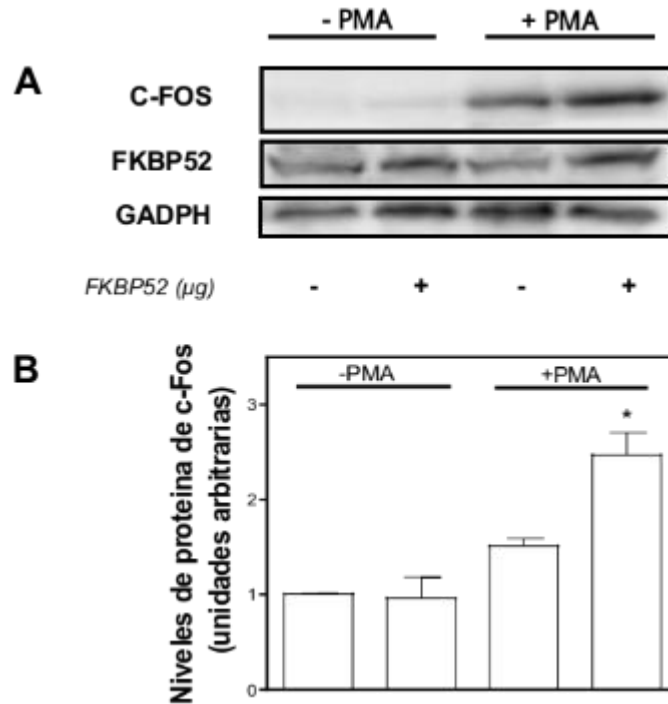


Figura 18. Efectos de FKBP52 sobre los niveles proteicos de c-Fos

A. Análisis de los niveles totales de la proteína c-Fos en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-hFKBP52. Tras 24 h de privación de suero, las células fueron incubadas con (+) o sin (-) PMA (100 ng/ml) durante 90 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como niveles totales de la proteína c-Fos (promedio \pm desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial del grupo control (cuyo valor arbitrario corresponde a 1). Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control inducido con PMA, determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

Para analizar con más detalle la regulación de FKBP52 sobre los niveles totales de c-Fos, analizamos como variaban las cantidades totales de proteína c-Fos a lo largo del tiempo. En condiciones de sobreexpresión de FKBP52, registramos mayores niveles totales de c-Fos, en comparación al grupo control, en el rango temporal comprendido entre 90-120 min de inducción con PMA. (Figura 19). De igual manera, abordamos el estudio de los efectos de la sobreexpresión de FKBP51. Para este caso, no encontramos cambios significativos con respecto al grupo control (Figura 19).

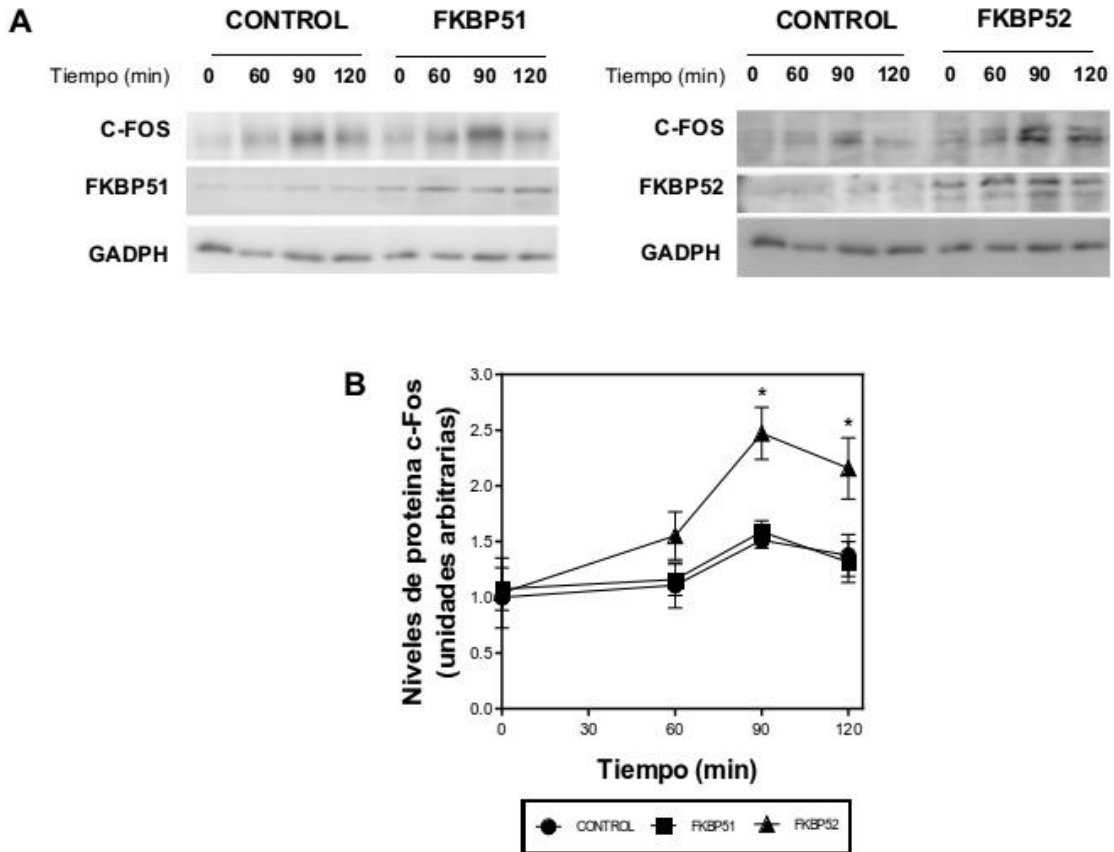


Figura 19. Efectos de FKBP5 sobre los niveles proteicos de c-Fos

A. Análisis de los niveles totales de la proteína c-Fos en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro), pCI-Neo-Flag-FKBP51 (grupo FKBP51, puntuación: cuadrado negro) o pCI-Neo-hFKBP52 (grupo FKBP52, puntuación: triángulo negro). Tras 24 h de privación de suero, las células se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-120 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como niveles totales de la proteína c-Fos (promedio \pm desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial del grupo control. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control para un tiempo dado, determinado por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

Con el fin de comprobar si los efectos observados de las FKBP5 sobre la regulación de los niveles de la proteína c-Fos tienen relación con el dominio PPlasa, se repitieron los ensayos evaluando en el tiempo los niveles totales de c-Fos luego de la transfección de las mutantes puntuales del dominio PPlasa de las FKBP5.

Conforme a lo esperado, la inhibición de la actividad enzimática del dominio PPlasa de FKBP52 provocó una pérdida del efecto regulatorio positivo de

FKBP52 sobre los niveles totales de c-Fos, sin cambios en su cinética de activación (Figura 20).

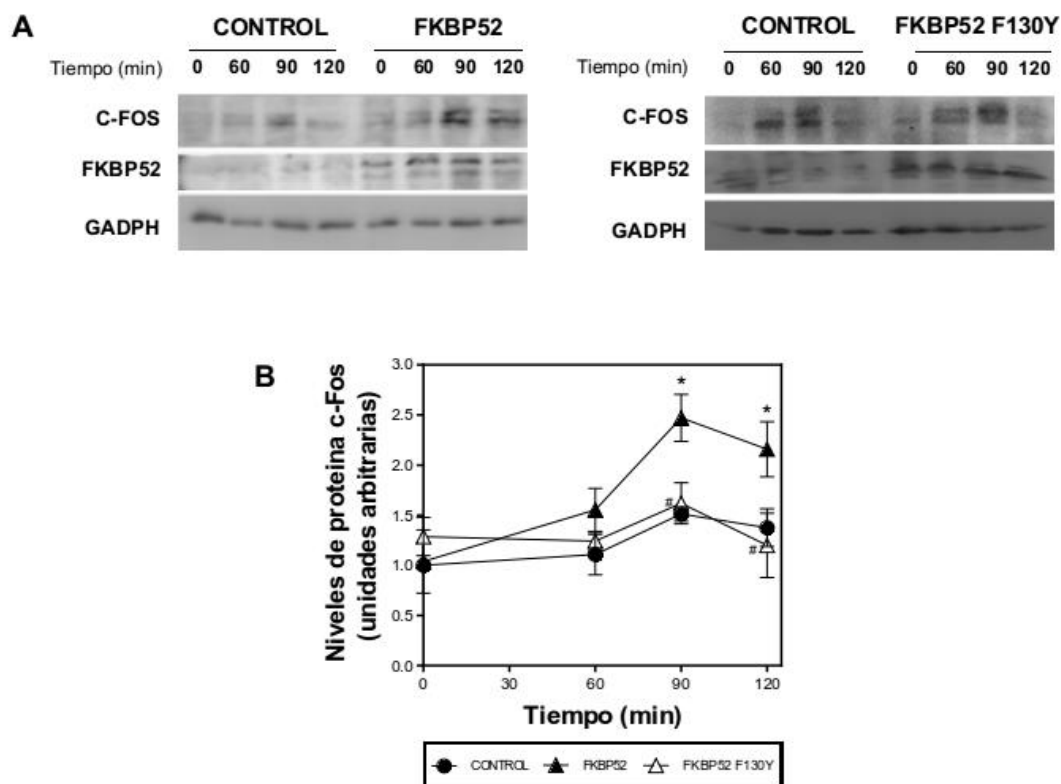


Figura 20. FKBP52 regula los niveles de proteína de c-Fos en forma dependiente de su actividad PPlasa

A. Análisis de los niveles de la proteína c-Fos en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro), pCI-Neo-FKBP52 (grupo FKBP52, puntuación: triángulo negro) o pCI-Neo-hFKBP52 F130Y (grupo FKBP52 F130Y, puntuación: cuadrado blanco). Tras 24 h de privación de suero, las células se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-120 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como niveles totales de la proteína c-Fos (promedio \pm desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial del grupo control. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control a un tiempo dado mientras que el numeral (#) toma como parámetro al grupo FKBP52.

Por el contrario, no se registraron cambios significativos en los niveles totales de c-Fos entre las células que sobreexpresaban FKBP51 salvaje y aquellas que sobreexpresaban la mutante puntual FKBP51 FD67/68DV, en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 21) .

En suma, estos resultados ratifican el estrecho vínculo funcional entre el dominio PPIasa de FKBP52 y los procesos que FKBP52 regula. Más aún, demostramos que FKBP51 no altera significativamente los niveles totales de c-Fos ante el estímulo con PMA y que la actividad enzimática de su dominio PPIasa no estaría involucrada en esta instancia de la vía de señalización de AP-1.

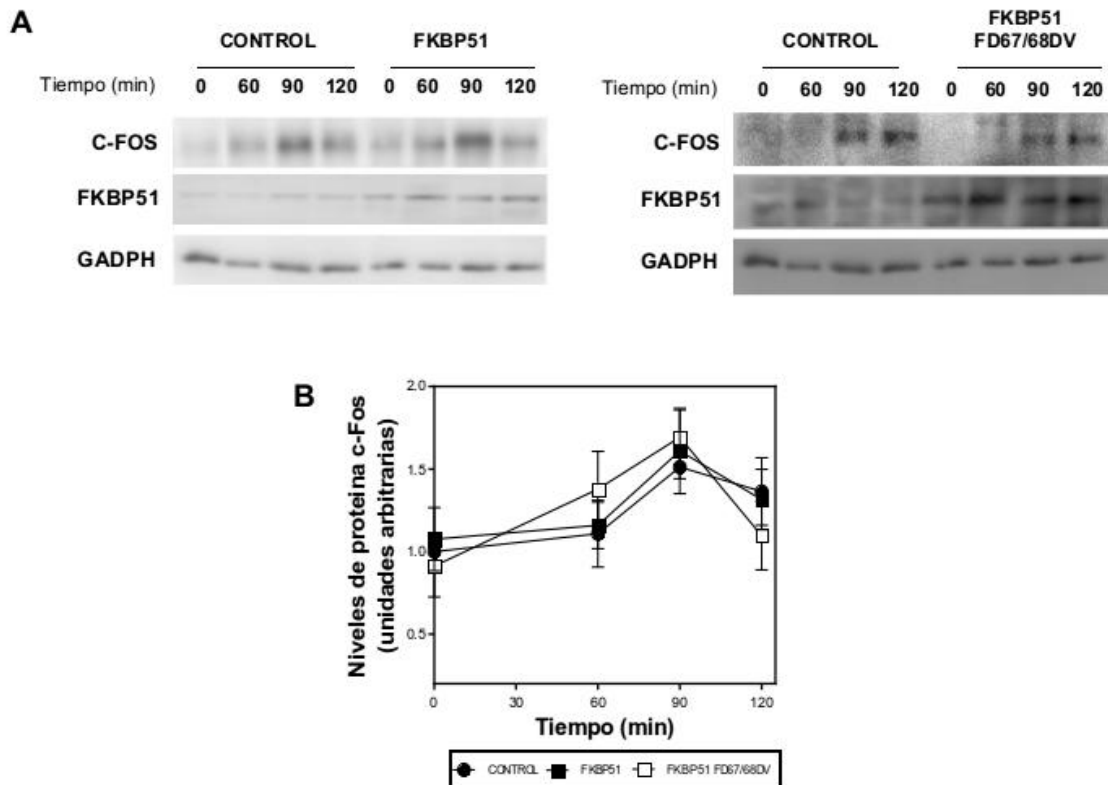


Figura 21. FKBP51 regula los niveles de proteína de c-Fos en forma dependiente de su actividad PPIasa

A. Análisis de los niveles totales de la proteína c-Fos en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro), pCI-Neo-Flag-FKBP51 (grupo FKBP51, puntuación: cuadrado oscuro) o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV (grupo FKBP51 FD67/68DV, puntuación: cuadrado blanco). Tras 24 h de privación de suero, las células se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-120 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como niveles totales de la proteína c-Fos (promedio \pm desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial del grupo control. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

1.3. Regulación de la fosforilación de c-Fos

Estudios previos indican que la proteína c-Fos es fosforilada en respuesta a una variedad de estímulos, entre los que se incluyen ésteres de forbol (Lee, 1994). Como previamente observamos en la Figura 17, la inducción de células trofoblásticas BeWo con PMA da lugar principalmente a dos bandas correspondiente a la proteína c-Fos total (aproximadamente de 50 kDa y 70 kDa). Continuando con el análisis de esta figura, nos preguntamos si la banda de 70 kDa correspondería a la proteína c-Fos fosforilada como respuesta al estímulo de PMA.

En este contexto, decidimos testear la identidad de la banda hiperfosforilada mediante el tratamiento con fosfatasa alcalina (FA). Lisados de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-hFKBP52 se incubaron con (+) o sin (-) FA durante 30 min a 37°C previo al ensayo de WB.

La incubación con FA se tradujo en la pérdida de las bandas de alto peso molecular de c-Fos, sugiriendo que el cambio de movilidad electroforética en las muestras inducidas con PMA se debía primordialmente a la fosforilación (Figura 22).

Curiosamente, se detectó un mayor grado de fosforilación de c-Fos por sobreexpresión de FKBP52 previo al tratamiento con FA. Esta observación nos permitió especular que FKBP52 favorecería niveles más elevados de fosforilación que, en consecuencia, estabilizan a c-Fos y lo protege frente a la degradación proteosómica.

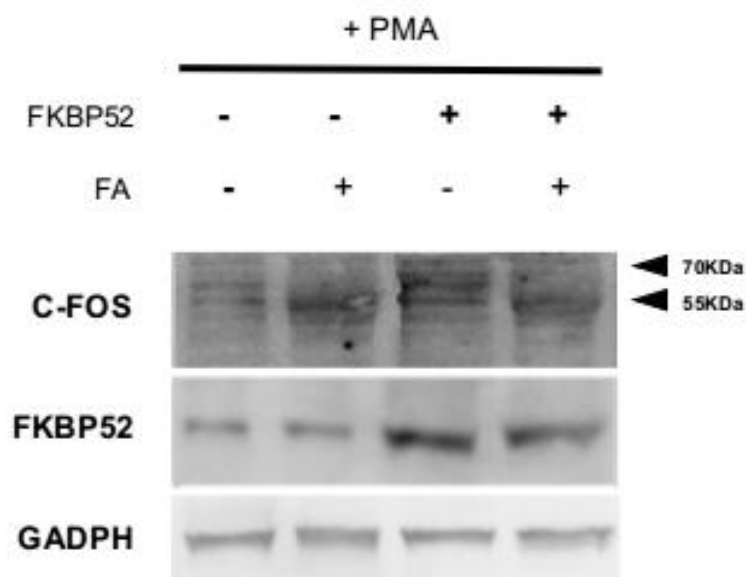


Figura 22. FKBP52 favorece un mayor grado de fosforilación de c-Fos

Análisis de los niveles totales de la proteína c-Fos procedentes de lisados de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-hFKBP52. Tras 24 h de privación de suero, las células se indujeron con PMA (100 ng/ml) durante 90 min. Una vez obtenida las fracciones totales de cada una de las condiciones experimentales, éstas se incubaron con (+) o sin (-) FA durante 30 min a 37°C. Las flechas del borde derecho de la figura señalan el peso molecular de las bandas correspondientes a la proteína c-Fos total.

1.4. Efectos de las FKBP52 sobre la estabilidad de c-Fos y

c-Jun

C-Fos es una proteína inestable y de acumulación transitoria. Tal como se mostró en la Figura 17, c-Fos tiene una vida media corta que alcanza su máximo nivel a los 90 min de inducción con PMA. Numerosos estudios señalan que la fosforilación de c-Fos mediada por diversas quinasas (ERK 1/2, RSK, ERK 5 y p38) afecta su estabilidad, localización subcelular, actividad transcripcional e interacción proteína-proteína (Chen, 1993; Deng, 1994; Murphy, 2002; Tanos, 2005; Terasawa, 2003). En este contexto, c-Fos es inicialmente fosforilada en dos posiciones del dominio C-terminal (S362 y S374) por ERK 1/2 y RSK. Ambas modificaciones postraduccionales cumplen un rol crítico en la estabilidad de c-Fos.

Teniendo en cuenta que c-Fos es una proteína regulada por fosforilación y que el grado de fosforilación aumenta en condiciones de sobreexpresión del gen *fkbp4* bajo el estímulo de PMA, estudiamos la modulación de las FKBP52 sobre la estabilidad de c-Fos. Para tal fin, redujimos el aporte de la síntesis de novo de c-Fos empleando un inhibidor de síntesis proteica. Entre los reactivos disponibles, optamos por puromicina dado que cicloheximida inhibe la actividad PPIasa de las FKBP52 (Christner,1999).

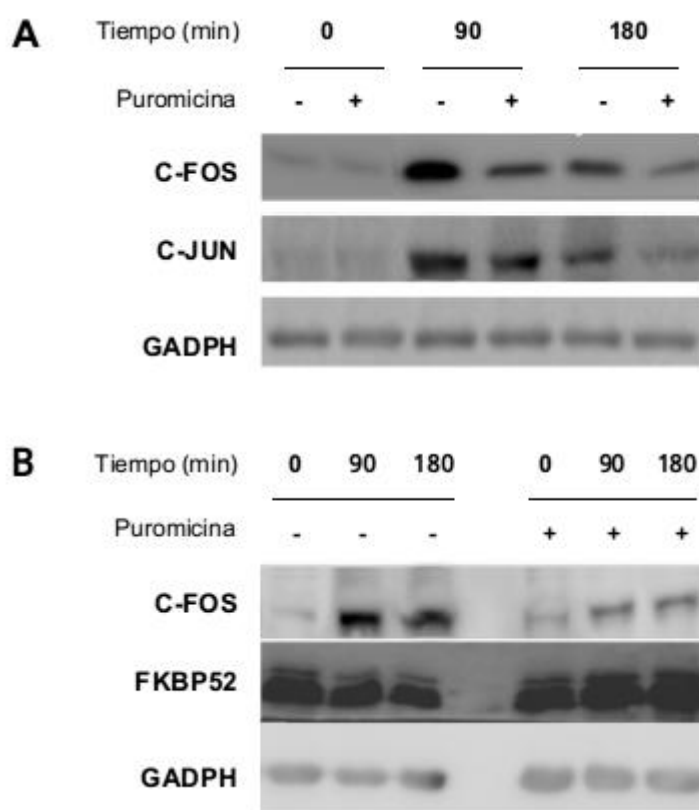


Figura 23. El tratamiento con puromicina disminuye los niveles de c-Fos y c-Jun en función del tiempo

Análisis de los niveles totales de las proteínas c-Fos y c-Jun procedentes de lisados de células BeWo transfectadas con el plásmido A) pCI-Neo (1 µg) o B) pCI-Neo-hFKBP52. Tras 24 h de privación de suero, se pretrataron con puromicina (1 µg/ml) durante 30 min y luego, se indujeron con PMA (100 ng/ml) durante 90 o 180 min.

La adición de puromicina previo al estímulo con PMA produjo la disminución en la cantidad total de proteína de dos miembros de la familia de AP-1, c-Fos y c-Jun. Tras 90 min de inducción con PMA, los niveles de c-Fos y c-Jun aumentan

significativamente con respecto al tiempo cero. Una vez ocurrida la inducción de AP-1, los niveles de proteína pasan a estar condicionados primordialmente por su estabilidad. Tras 180 min de inducción con PMA, los niveles de c-Fos y c-Jun con (+) puromicina decaen a niveles próximos de la condición basal para la condición de células BeWo transfectadas con el plásmido pCI-Neo (Figura 23 A). Por el contrario, en condiciones de sobreexpresión de FKBP52, los niveles de c-Fos se mantienen constantes entre los 90 y 180 min, incluso cuando la síntesis de novo está inhibida con puromicina (Figura 23 B).

Seguidamente, se analizó la estabilidad de c-Fos en condiciones de sobreexpresión de las FKBP5s y en presencia de puromicina (Figura 24).

Tal como se observa en la figura 24, tras 90 min de inducción con PMA, los niveles totales de proteína c-Fos fueron similares para las tres condiciones experimentales (control, FKBP51 y FKBP52). Probablemente, esto responda a los efectos de la puromicina. Bien podría suceder que, esta droga atenúe el aporte *de novo* de proteína c-Fos y por ende, reduzca las diferencias detectadas previamente entre las condiciones ensayadas (Figuras 20 y 21). En contraste, tras 180 min post-estimulación con PMA, los niveles totales de proteína c-Fos variaron en forma diferencial para FKBP51 y FKBP52. Por un lado, se percibió una marcada caída de la cantidad total de la proteína c-Fos del grupo FKBP51 y la condición control. Por otro lado, en condiciones de sobreexpresión de FKBP52 se obtuvieron niveles sostenidos de proteína c-Fos, con valores semejantes al tiempo 90 min. Las observaciones anteriores sugieren que dado que el aporte de novo de c-Fos está inhibido, FKBP52 es más efectivo estabilizando a c-Fos y protegiéndolo frente a la degradación. Más aún, estos efectos de estabilización mediados por FKBP52 no se circunscribieron solamente a c-Fos sino que también fueron observados en forma similar con c-Jun (Figura 25).

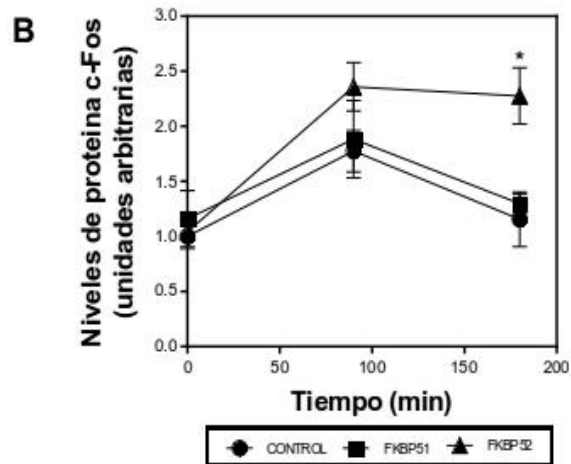
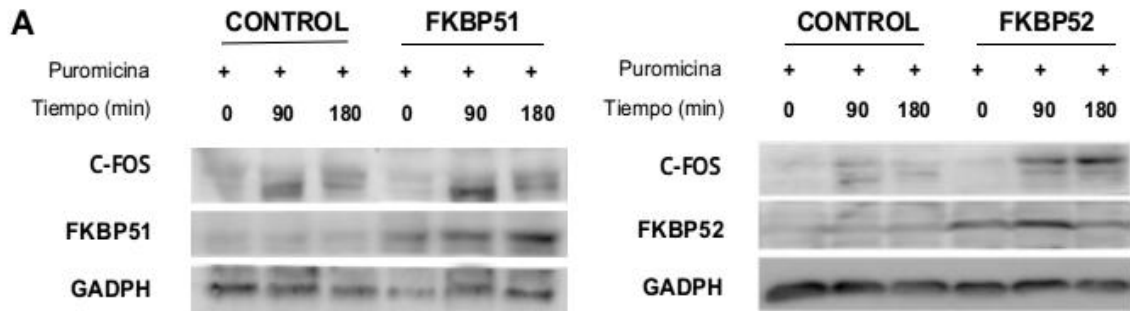


Figura 24. Efectos de FKBP5 sobre la estabilidad de c-Fos

A. Análisis de los niveles totales de la proteína c-Fos en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro), pCI-Neo-Flag-FKBP51 (grupo FKBP51, puntuación: cuadrado negro) o pCI-Neo-hFKBP52 (grupo FKBP52, puntuación: triángulo negro). Tras 24 h de privación de suero, las células se pretrataron con puromicina (1 µg/ml) y luego, se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-180 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como niveles totales de la proteína c-Fos (promedio ± desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial del grupo control. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control para un tiempo dado, determinado por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

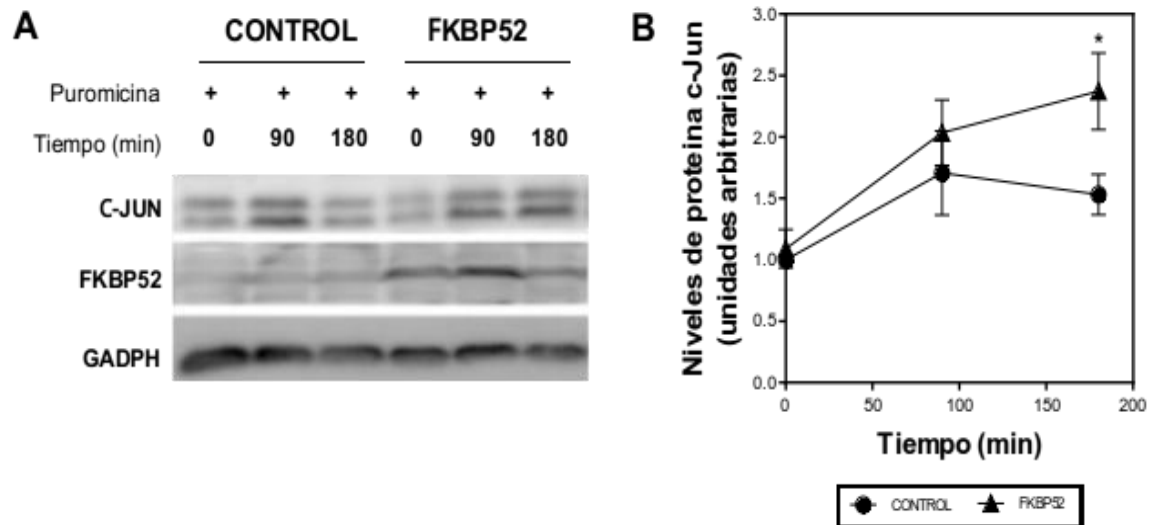


Figura 25. FKBP52 aumenta la estabilidad de c-Jun

A. Análisis de los niveles totales de la proteína c-Jun en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, puntuación: círculo negro) o pCI-Neo-hFKBP52 (grupo FKBP52, puntuación: triángulo negro). Tras 24 h de privación de suero, las células se pretrataron con puromicina (1 $\mu\text{g/ml}$) y luego, se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0- 180 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como niveles totales de la proteína c-Jun (promedio \pm desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial del grupo control. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control para un tiempo dado, determinado por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

Para profundizar el papel que cumple el dominio PPlasa de las FKBP5 sobre la estabilidad de c-Fos, efectuamos un análisis de la estabilidad de c-Fos a un único tiempo de inducción con PMA (180 min), para el cual, ya previamente habíamos registrado diferencias significativas entre el grupo control y FKBP52 (Figura 26).

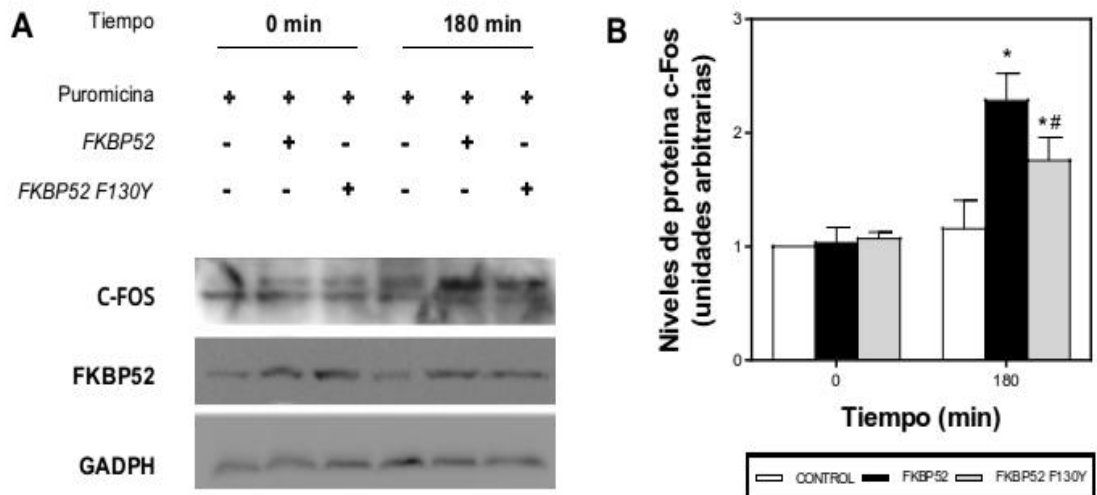


Figura 26. FKBP52 regula estabilidad de c-Fos de manera dependiente de su actividad PPlasa

A. Análisis de los niveles totales de proteína c-Fos en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, columna blanca), pCI-Neo-hFKBP52 (grupo FKBP52, columna negra) o pCI-Neo-hFKBP52 F130Y (grupo FKBP52 F130Y, columna gris) . Tras 24 h de privación de suero, las células se pretrataron con puromicina (1 µg/ml) y luego, se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante 180 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como niveles totales de la proteína c-Fos (promedio ± desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial del grupo control. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones experimentales inducidas con PMA por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma como parámetro al grupo FKBP52.

En consonancia con los resultados anteriores, no se observó la misma cantidad total de la proteína c-Fos acumulada por FKBP52 (a los 180 min post-estimulación con PMA y pretratamiento con puromicina) al sobreexpresar la mutante puntual de FKBP52 F130Y. Estas observaciones permite relacionar a FKBP52 con un incremento en la estabilidad de c-Fos, siendo esta regulación dependiente de su actividad PPlasa.

A continuación, se determinaron las consecuencias de la sobreexpresión de la mutante puntual de FKBP51 FD67/68DV sobre la estabilidad de c-Fos.

Previamente, detectamos que FKBP51 no modifica la vida media de la proteína c-Fos, al menos, durante el intervalo de tiempo ensayado (Figura 26). Aún así, nos preguntamos si la inhibición de la actividad enzimática del dominio

PPIasa de FKBP51 generaría un cambio visible en los niveles de c-Fos ante el pretratamiento con puromicina. En la Figura 27, se observa que al sobreexpresar la mutante FKBP51 FD67/68DV se detecta el mismo nivel de c-Fos alcanzado por la condición de FKBP51 salvaje.

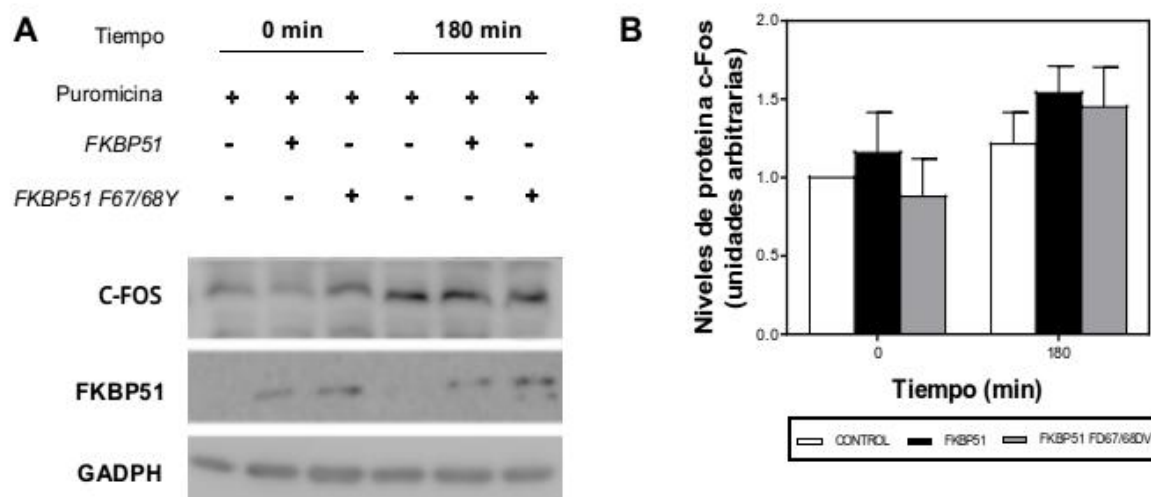


Figura 27. La actividad enzimática del dominio PPIasa de FKBP51 no interviene en la estabilidad de c-Fos

A. Análisis de los niveles totales de la proteína c-Fos en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (grupo control, columna blanco), pCI-Neo-Flag-hFKBP51 (grupo FKBP51, columna negra) o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV (grupo FKBP51 FD67/68DV, columna gris). Tras 24 h de privación de suero, las células se pretrataron con puromicina (1 µg/ml) y luego, se incubaron con PMA (100 ng/ml) durante 180 min.

B. Densitometría de bandas expresadas como niveles totales de la proteína c-Fos (promedio ± desvío estándar), normalizadas al tiempo inicial del grupo control. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

Englobando, los resultados del apartado 1.4 podemos concluir que FKBP52 cumple un importante rol en la estabilización de c-Fos y c-Jun. Este novedoso mecanismo dependiente de FKBP52 se hace visible luego del pico máximo de expresión proteica (90 min) y se mantiene al menos hasta las 180 min de inducción con PMA. En cuanto a FKBP51, en base a los resultados obtenidos, no intervendría en la regulación de la vida media de c-Fos.

1.5. Efectos de las FKBP's sobre la distribución subcelular de c-Fos

El transporte de c-Fos desde el citoplasma (donde es sintetizado) hacia el núcleo (donde opera como parte del heterodímero AP-1) no es un proceso espontáneo. Por el contrario, depende tanto de factores extracelulares como intracelulares. Está descrito que, en células deprivadas de suero, c-Fos se acumula predominantemente en el citoplasma (Vriz, 1992). Sin embargo, una vez activado por un estímulo específico, c-Fos transloca al núcleo. La activación de PKA y/o las quinasas Ser/Thr de la cascada de las MAPKs cumplen un rol activo en la distribución subcelular de c-Fos (Roux, 1990; Köhl, 1991). Se especula que existiría un inhibidor lábil del transporte de c-Fos o de c-Jun. Entre los posibles candidatos, se encuentra la proteína IP-1. Esta proteína preferentemente citoplásmica interacciona con c-Fos y c-Jun, siendo esta interacción reversible por fosforilación de PKA, PKC y CAMKII (Ca²⁺/Calmodulina Proteína quinasa II) (Auwerx y Sassone Corsil, 1991).

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores, nos llevaron a plantear la importancia de evaluar la localización de c-Fos en condiciones de sobreexpresión de las FKBP's mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Por consiguiente, evaluamos la localización subcelular de c-Fos en un intervalo de tiempo comprendido entre 0-180 min posteriores al estímulo con PMA.

A partir del análisis de las imágenes de fluorescencia, se determinó el porcentaje del número de células positivas, empleando una escala arbitraria de distribución subcelular de c-Fos que se muestra en la Figura 28. Cabe mencionar que, solo se contabilizaron como positivas a aquellas células con c-Fos nuclear (escala 4).

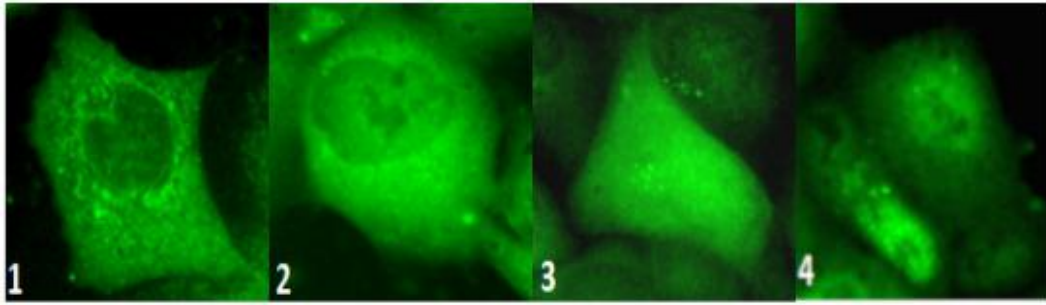


Figura 28. Escala arbitraria de la distribución subcelular de c-Fos

Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a la distribución subcelular de c-Fos. Se clasificó arbitrariamente la localización de c-Fos en 4 categorías: 1) Exclusivamente citoplasmática, 2) Predominantemente citoplasmática, 3) Similarmente distribuido en núcleo y citoplasma y 4) Mayoritariamente nuclear.

Conforme a lo reportado en la bibliografía, en ausencia de estímulo, c-Fos se ubica mayoritariamente en el citoplasma.

Al estimular las células del grupo control con PMA, se observó que c-Fos transloca al núcleo (excluyéndose de los nucleolos). El máximo de acumulación se alcanza a los 90 min de inducción. Transcurrido ese tiempo, se detectó que la fracción nuclear de c-Fos decae a valores basales (Figura 29 A). En condiciones de sobreexpresión de FKBP5, la cinética de importación de c-Fos difirió del grupo control. En el caso de FKBP51, se observó una ralentización de la entrada de c-Fos al núcleo con un corrimiento del máximo de acumulación de c-Fos (que data de 120 min post inducción con PMA). La fracción nuclear máxima acumulada, en condiciones de sobreexpresión de FKBP51, resultó menor al pico de acumulación alcanzada por el grupo control a los 90 min (Figura 29 B). Por último, FKBP52 presentó una acumulación sostenida de c-Fos nuclear entre los 90 y 120 min de inducción con PMA (Figura 29 C).

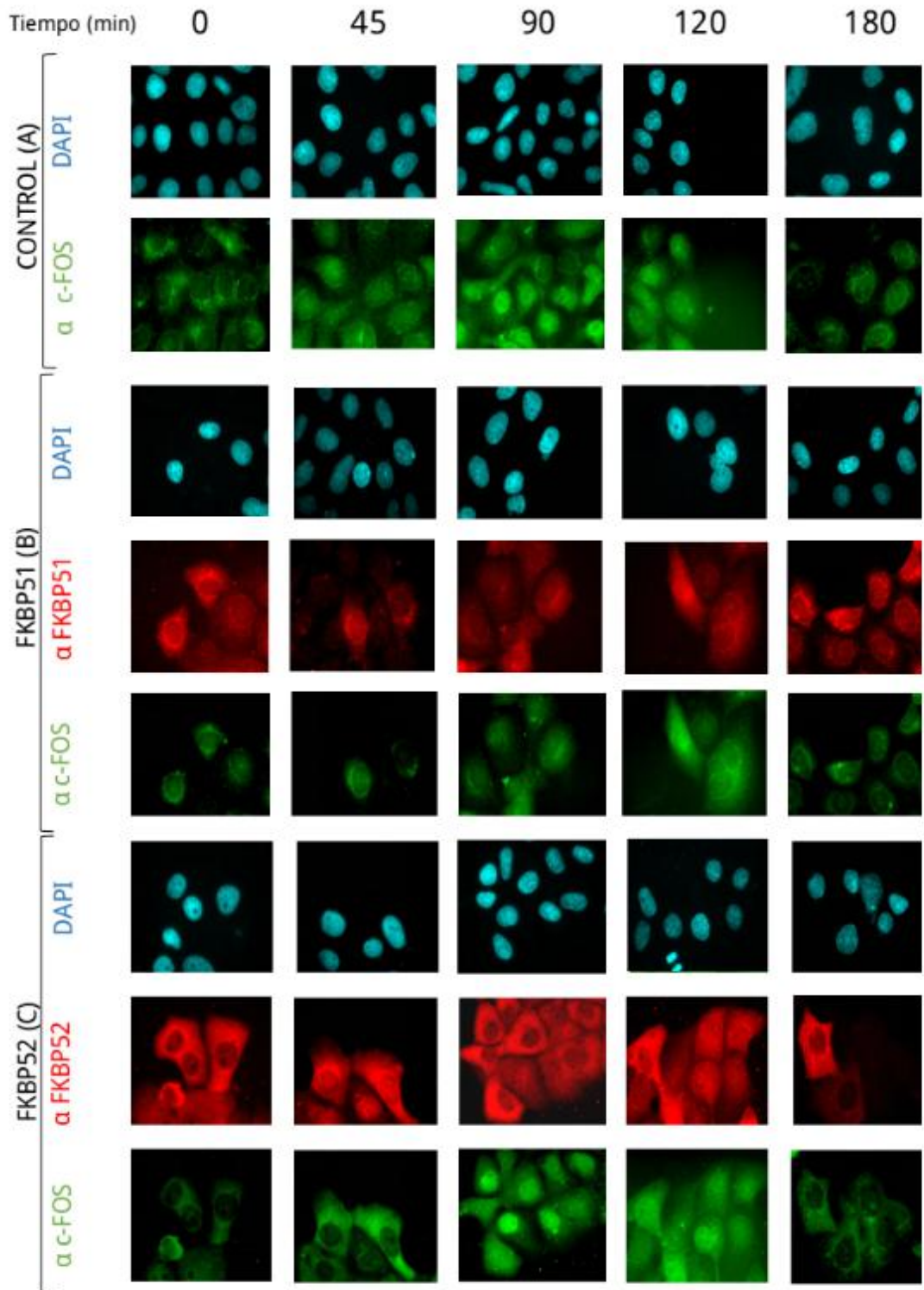


Figura 29 . Las FKBP5 regulan la distribución subcelular de c-Fos

Imágenes de microscopía de una doble inmunofluorescencia (c-Fos [verde], FKBP5 [rojo] y núcleos [cyan]) correspondiente a la importación nuclear de c-Fos bajo el estímulo de PMA (100 ng/ml) a distintos tiempos comprendidos en el intervalo 0-180 min para las condiciones: control (A), FKBP51 (B) y FKBP52 (C).

En la Figura 30, se muestra la cuantificación de la fracción nuclear de c-Fos (%) para las tres condiciones experimentales durante el intervalo de tiempo 0-180 min.

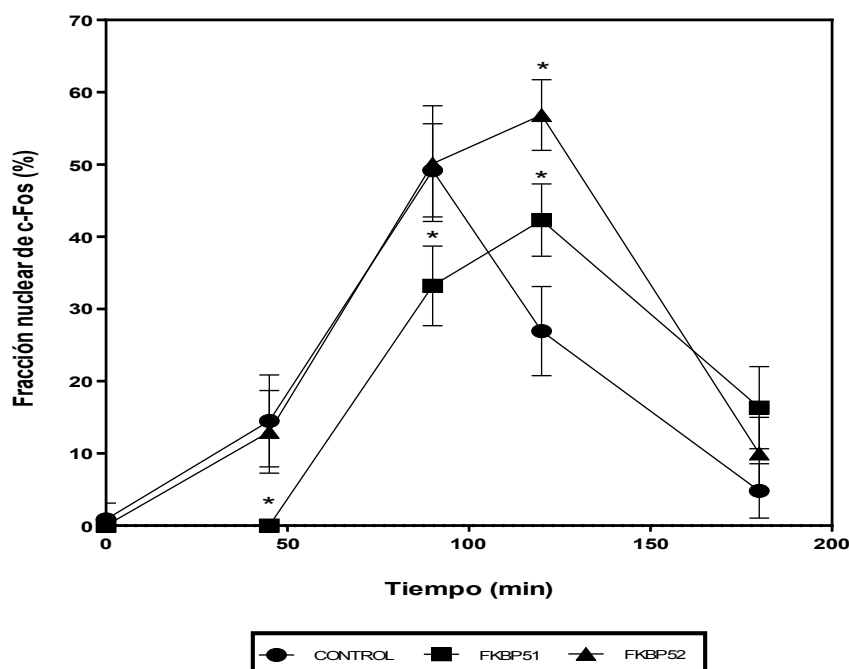


Figura 30. Cuantificación de la distribución subcelular de c-Fos en condiciones de sobreexpresión de FKBP5

Cuantificación del número de células positivas con c-Fos nuclear bajo el estímulo de PMA (100 ng/ml) a distintos tiempos del intervalo comprendido entre 0-180 min.

El número de células positivas de cada tiempo particular se normaliza al tiempo inicial de cada condición experimental. Los resultados se expresan como porcentaje de la fracción nuclear de c-Fos (%) (promedio \pm desvío estándar) para las 3 condiciones experimentales: Control (puntuación: círculo negro), FKBP51 (puntuación: cuadrado negro) y FKBP52 (puntuación: triángulo negro). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control para un tiempo dado, determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

Para una mayor caracterización de la regulación de las FKBP5 sobre la localización de c-Fos, se llevaron a cabo nuevos ensayos de inmunofluorescencia indirecta incorporando las mutantes puntuales del dominio PPIasa de las FKBP5. Además, se acotó el rango temporal de análisis de modo de centrarnos en aquellos tiempos para los cuales se observaron diferencias significativas entre el grupo control y las FKBP5.

En condiciones de sobreexpresión de la mutante FKBP52 F130Y, se manifestó una pérdida significativa de los efectos de retención nuclear mediados por FKBP52 (Figura 31 y Figura 32).

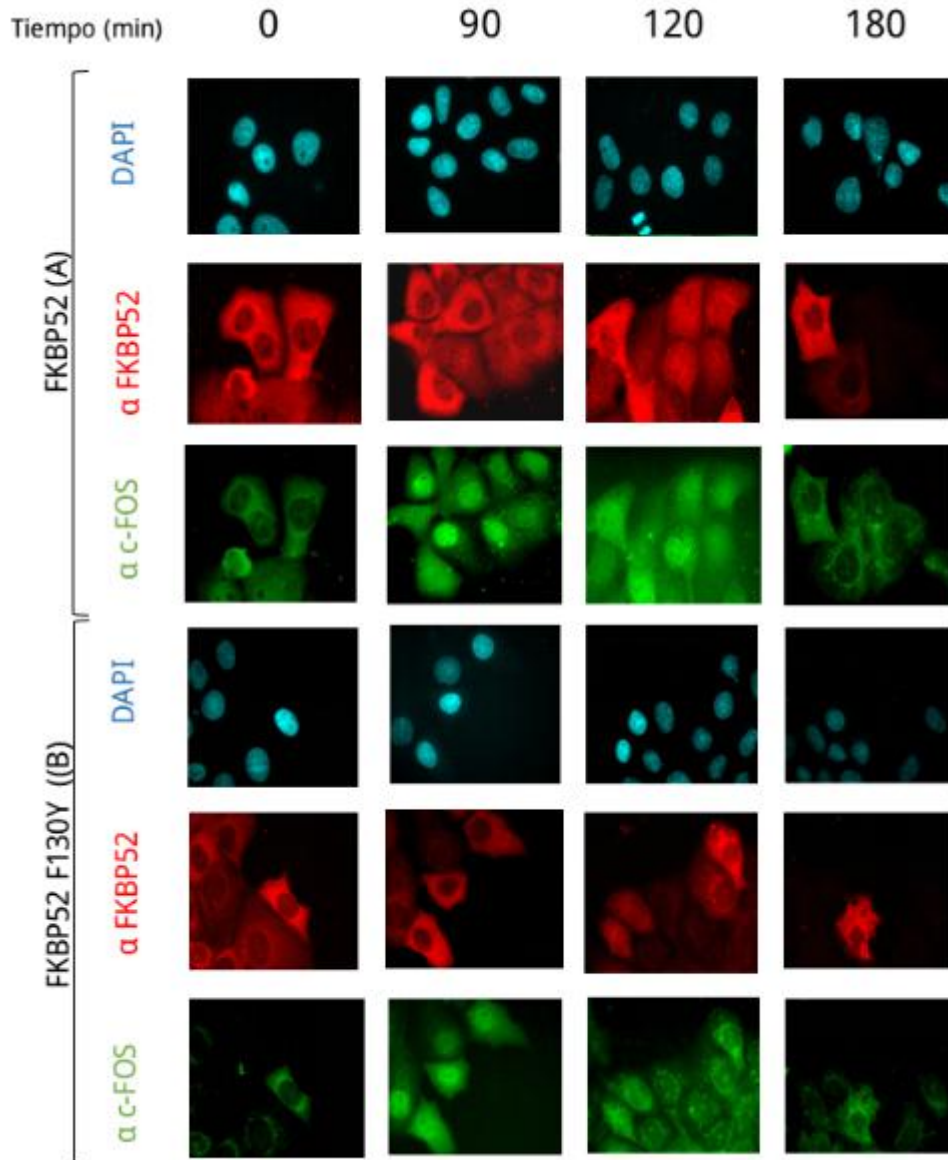


Figura 31. FKBP52 aumenta la retención nuclear de c-Fos

Imágenes de microscopía de una doble inmunofluorescencia (c-Fos [verde], FKBP52 [rojo] y núcleos [cyan]) correspondiente a la importación nuclear de c-Fos bajo el estímulo de PMA (100 ng/ml) a distintos tiempos comprendidos en el intervalo 0-180 min para las condiciones: FKBP52 (A) y FKBP52 F130Y (B).

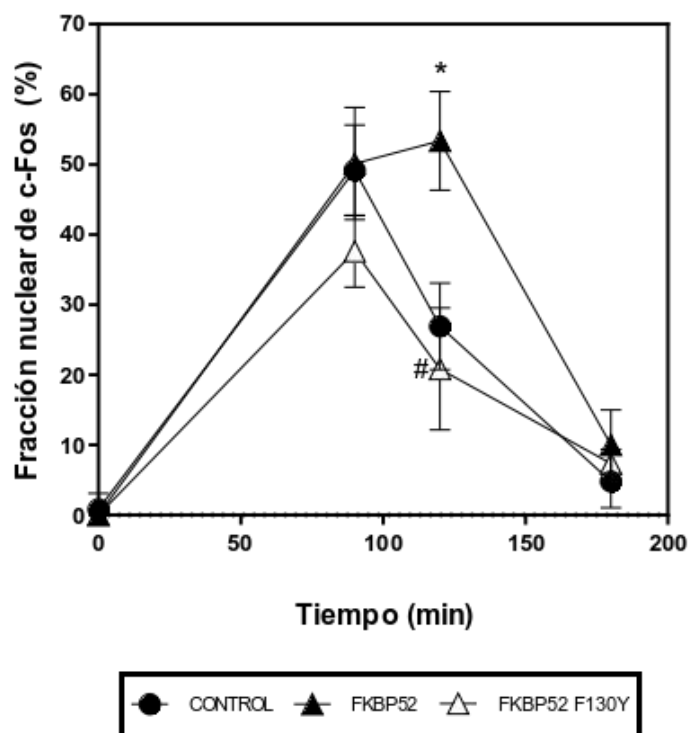


Figura 32. Cuantificación de la distribución subcelular de c-Fos en condiciones de sobreexpresión de FKBP52 o FKBP52 F130Y

Cuantificación del número de células positivas con c-Fos nuclear bajo el estímulo de PMA (100 ng/ml) a distintos tiempos del intervalo comprendido entre 0-180 min.

El número de células positivas de cada tiempo particular se normaliza al tiempo inicial de cada condición experimental. Los resultados se expresan como porcentaje de la fracción nuclear de c-Fos (%) (promedio \pm desvío estándar) para las 3 condiciones experimentales: Control (puntuación: círculo negro), FKBP52 (puntuación: triángulo negro) y FKBP52 F130Y (puntuación: triángulo blanco). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones experimentales determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control mientras que el numeral (#) toma como parámetro al grupo FKBP52.

Por otro lado, en condiciones de sobreexpresión de FKBP51 FD67/68DV se detectó una distribución subcelular de c-Fos similar al grupo control. Tras 90 min de inducción con PMA, se detectó un aumento transitorio de la fracción nuclear de c-Fos seguida de una disminución de la fracción acumulada para tiempos ulteriores (Figura 33 y Figura 34).

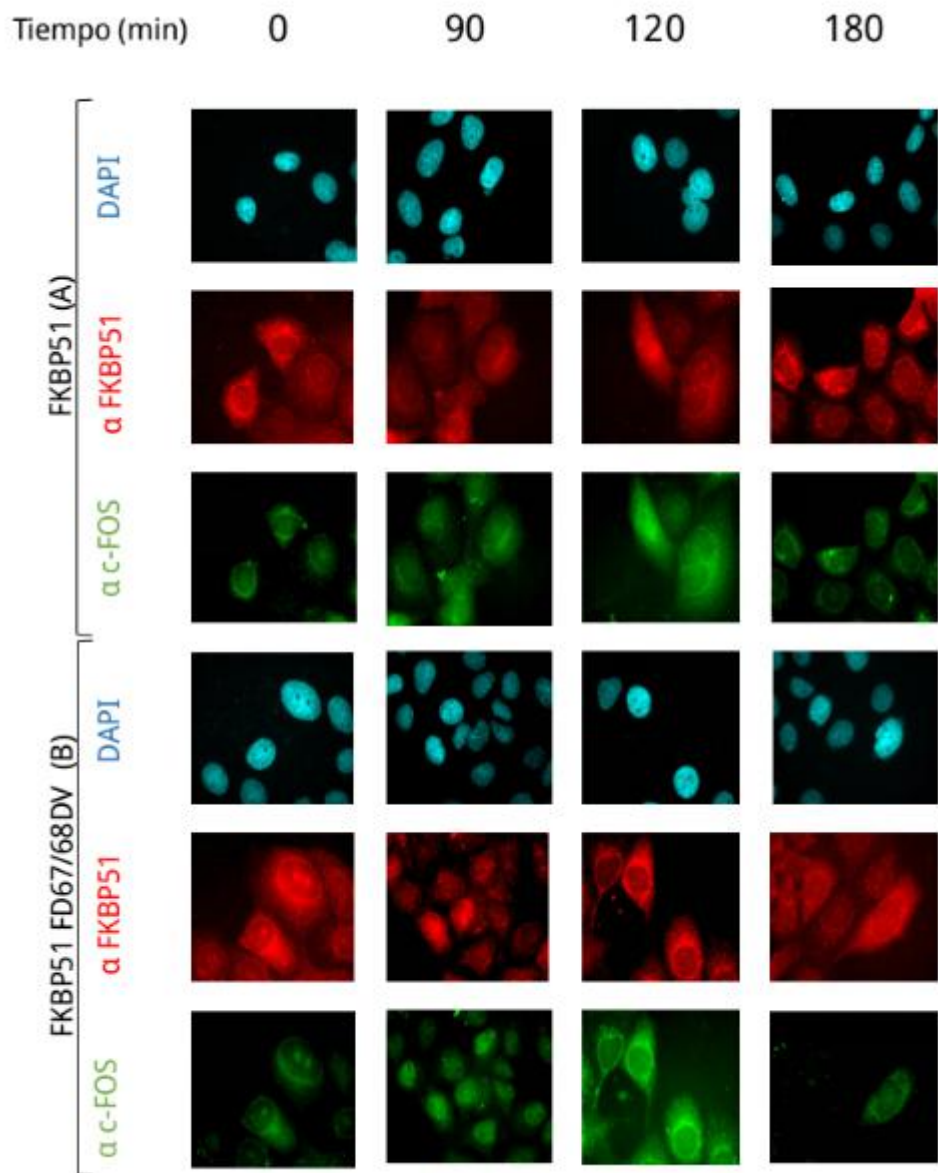


Figura 33. FKBP52 retrasa la translocación nuclear de c-Fos

Imágenes de microscopía de una doble inmunofluorescencia (c-Fos [verde], FKBP51 [rojo] y núcleos [cyan]) correspondiente a la importación nuclear de c-Fos bajo el estímulo de PMA (100 ng/ml) a distintos tiempos comprendidos en el intervalo 0-180 min para la condiciones: FKBP51 (A) y FKBP51 FD67/68DV (B).

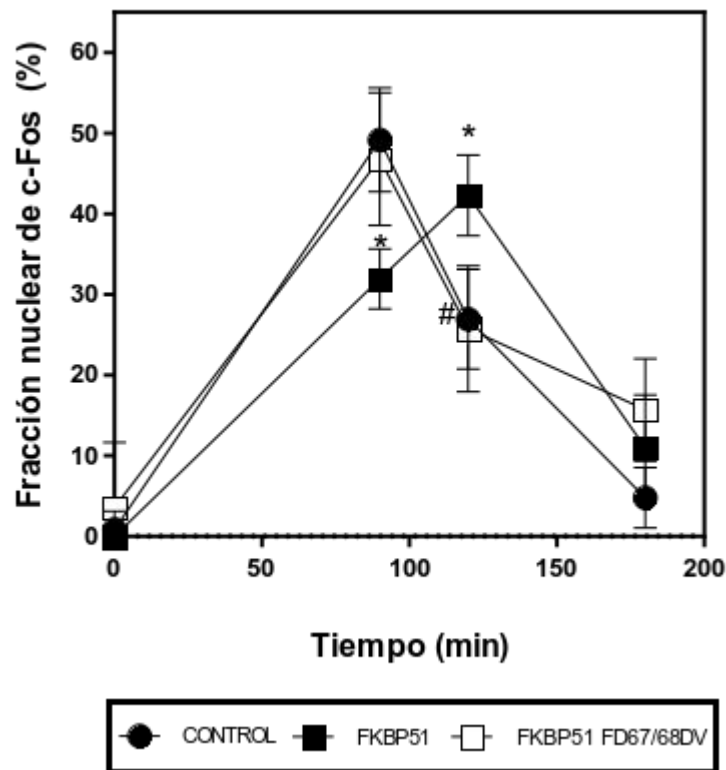


Figura 34. Cuantificación de la distribución subcelular de c-Fos en condiciones de sobreexpresión de FKBP51 o FKBP51 FD67/68DV

Cuantificación del número de células positivas con c-Fos nuclear bajo el estímulo de PMA (100 ng/ml) a distintos tiempos del intervalo comprendido entre 0 - 180 min.

El número de células positivas de cada tiempo particular se normaliza al tiempo inicial de cada condición experimental. Los resultados se expresan como porcentaje de la fracción nuclear de c-Fos (%) (promedio \pm desvío estándar) para las 3 condiciones experimentales: Control (puntuación: círculo negro), FKBP51 (puntuación: cuadrado negro) y FKBP51 FD67/68DV (puntuación: triángulo blanco). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones experimentales determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control mientras que el numeral (#) toma como parámetro al grupo FKBP51.

Englobando los resultados de este apartado, podemos concluir que las FKBP5s modifican la distribución subcelular de c-Fos bajo el estímulo de PMA para los tiempos comprendidos en el intervalo de 0-180 min. Por un lado, observamos que FKBP51 interviene en el transporte nuclear de c-Fos. En efecto, esta INM retrasa la entrada de c-Fos al núcleo y altera la fracción máxima acumulada en la organela. Más aún, se ha detectado que al sobreexpresar la mutante FKBP51 FD67/68DV ocurren cambios significativos en el patrón de

importación nuclear de c-Fos mediado por FKBP51. Esto sugiere que la regulación de FKBP51 sobre el transporte de c-Fos al núcleo es dependiente de la actividad enzimática de su dominio PPlasa. Por otro lado, FKBP52 favorece un notorio aumento de la retención nuclear de c-Fos. La acción de FKBP52 sobre la distribución subcelular de c-Fos resulta dependiente de su dominio PPlasa. En conjunto, la actividad PPlasa de FKBP52 sería necesaria para modular positivamente la estabilidad de c-Fos inducida por PMA y prolongar en el tiempo su localización nuclear.

1.6. Efectos de las FKBP5 sobre la actividad transcripcional de AP-1

La actividad biológica de AP-1 se desencadena en respuesta a una variedad de estímulos, entre los cuales se incluyen los ésteres de forbol (PMA o TPA), el estrés celular causado por radiaciones ionizantes, el daño sobre el ADN, los factores de crecimiento, los rearrreglos del citoesqueleto y las citoquinas.

A fin de analizar la respuesta de nuestro sistema biológico frente a estímulos clásicos de AP-1, realizamos ensayos de gen reportero. Para tal fin, empleamos un plásmido reportero de AP-1, que contiene múltiples sitios de unión a dicho factor de transcripción río arriba del promotor mínimo y del gen de la luciferasa. Acto seguido, medimos la actividad transcripcional de AP-1 ensayando a distintos tiempos de inducción y concentraciones de estímulos.

En la caracterización de la actividad transcripcional de AP-1, se emplearon dos líneas celulares: HEK-293T y BeWo.

Las células HEK-293T fueron seleccionadas, en primera instancia, dada su alta eficiencia de transfección y bajos niveles endógenos de FKBP5. Ambas características las convirtieron en un modelo atractivo y sensible para evidenciar cambios biológicos determinados por variaciones en la expresión de las INMs.

Por otro lado, las células BeWo constituyen un modelo de células trofoblásticas ampliamente difundido que cuenta con la limitación práctica de tener una baja eficiencia de transfección. Por ello, este tipo celular se utilizó solo para aquellos diseños experimentales en los cuales se transfectó un reducido número de construcciones plasmídicas.

Según se observa en la Figura 35, la magnitud de respuesta (veces de inducción de AP-1) frente al estímulo de PMA en células HEK-293T resultó aproximadamente 5 veces superior a la observada en las células BeWo.

La máxima actividad transcripcional de AP-1 se alcanzó entre las 4-6 h en BeWo y 6-8 h en HEK-293T. Curiosamente, la inducción de las células BeWo durante 8 h con PMA se tradujo en una ausencia o bajos niveles de actividad transcripcional de AP-1. A modo de estandarizar las condiciones de trabajo en ambas líneas celulares, se decidió utilizar una concentración de 100 ng/ml de PMA a un tiempo de inducción de 6 h para los ensayos reporteros ulteriores.

De igual manera, se evaluaron otros estímulos convencionales de AP-1 en células HEK-293T, tales como el TBOOH (fuente de estrés oxidativo) y las interleuquinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 (estímulo proinflamatorio).

En la Figura 36 se observa que la inducción con TBOOH durante 30 min fue efectiva para las concentraciones de 50 μ M y 100 μ M. Fijando la concentración del TBOOH a 50 μ M, se efectuó una curva de tiempo y se evidenció una disminución significativa de la actividad transcripcional de AP-1 a tiempos más prolongados de inducción, probablemente, como respuesta a los efectos pro-apoptóticos del TBOOH.

En cuanto al efecto de las interleuquinas, se visualiza en la Figura 37 que la IL-1 β es la única del conjunto de interleuquinas ensayadas en aumentar significativamente la actividad transcripcional de AP-1 (2 veces de inducción). De las dos concentraciones utilizadas, la IL-1 resultó efectiva en este sistema a la concentración más baja (1.5 ng/ml).

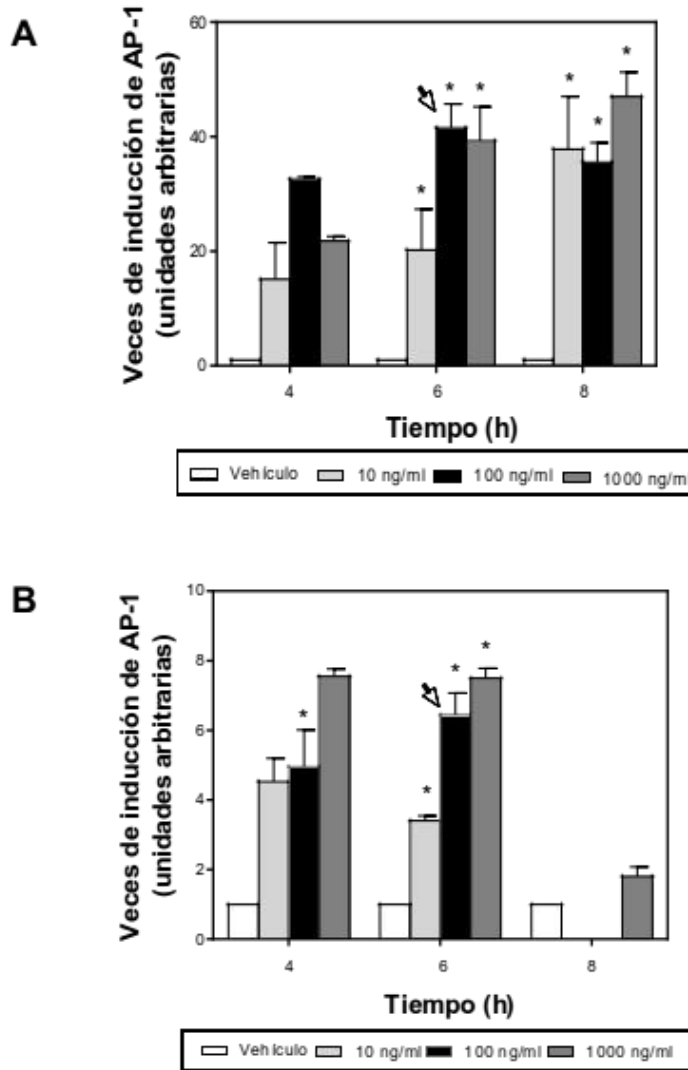


Figura 35. Efectos de PMA sobre la actividad transcripcional de AP-1

Células HEK-293T (A) y células BeWo (B) fueron cotransfectadas con los plásmidos reporteros AP-1-luc y β -Galactosidasa. La inducción se llevó a cabo en un rango de concentraciones de 10-1000 ng/ml, durante intervalos de tiempos variables (4, 6 u 8 h). La flecha de color negro resalta la concentración de PMA y tiempo de inducción elegido. Los resultados se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio \pm desvío estándar), en unidades arbitrarias resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β -galactosidasa, y se relativizan al valor promedio del grupo control (vehículo, cuyo valor arbitrario corresponde a 1). El asterístico (*) indica diferencias significativas con respecto al control (vehículo) según la prueba estadística Anova ($p < 0.05$).

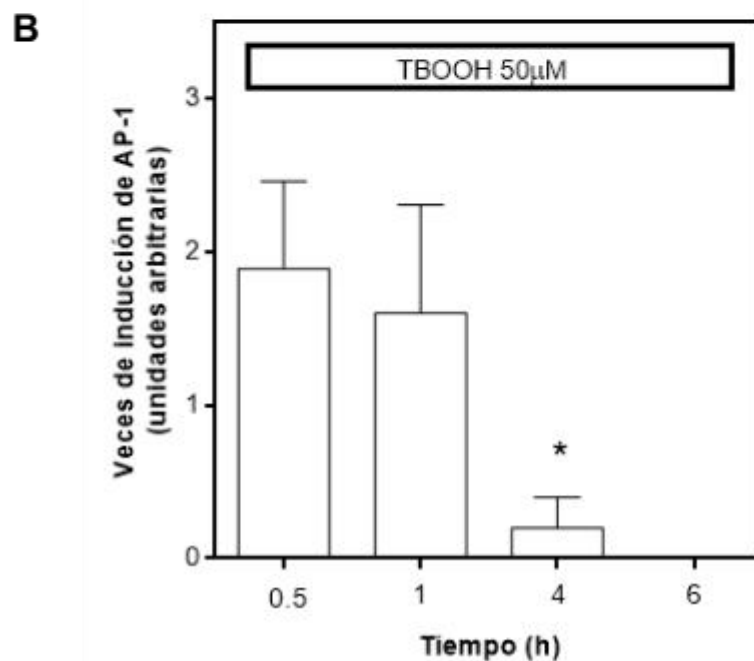
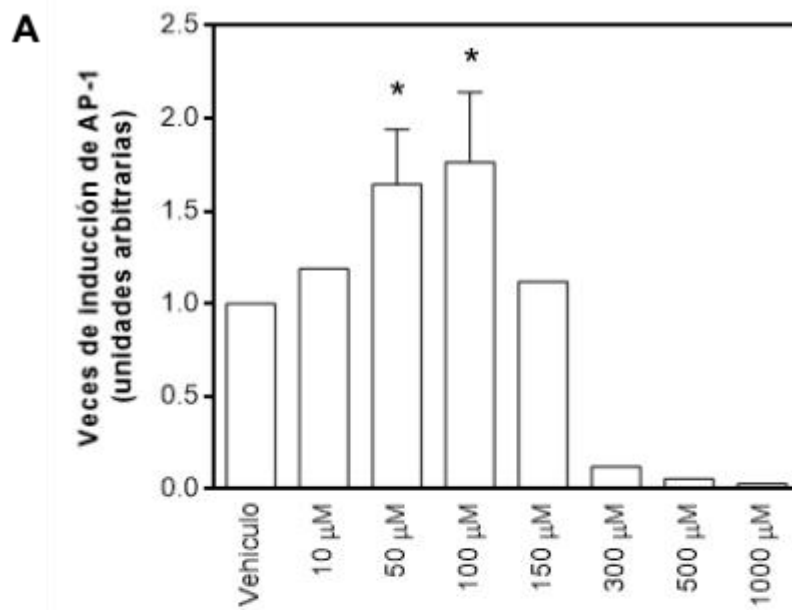


Figura 36. Efectos del TBOOH sobre la actividad transcripcional de AP-1

A. Células HEK-293T fueron cotransfectadas con plásmidos reporteros AP1-luc y β -Galactosidasa. La inducción se llevó a cabo en un rango de concentraciones de 10 - 1000 μ M, durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo, se removió el medio estimulado y se agregó medio fresco. La medición se efectuó a las 6 h posteriores al estímulo con TBOOH.

B. A una concentración fija de TBOOH 50 μ M, la incubación efectiva con TBOOH se efectuó a intervalos de tiempo variables. Transcurrido dicho tiempo, se removió el medio estimulado y se agregó medio fresco. Los resultados se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio \pm desvío estándar), en unidades arbitrarias resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β -galactosidasa, y se relativizan al valor promedio del grupo control (vehículo, cuyo valor arbitrario corresponde a 1). El asterisco (*) indica diferencia significativas con respecto al control según la prueba Anova.

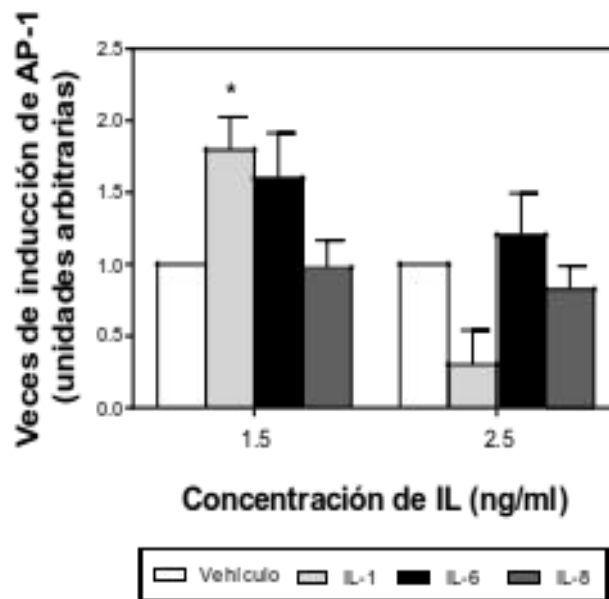


Figura 37. Efectos de interleuquinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) sobre la actividad transcripcional de AP-1

Células HEK-293T fueron cotransfectadas con los plásmidos reporteros AP1-luc y β -Galactosidasa. La inducción se llevó a cabo en 2 concentraciones (1.5 y 2.5 ng/ml) durante 6 h. Los resultados se expresan como veces de inducción (promedio \pm desvío estándar), en unidades arbitrarias resultado del cociente entre la actividad de luciferasa/ β -galactosidasa, y se relativizan al valor promedio del grupo control (vehículo, cuyo valor arbitrario corresponde a 1). El asterístico (*) indica diferencias significativas con respecto al control según la prueba Anova ($p < 0.05$).

La actividad transcripcional de AP-1 juega un rol fundamental en una variedad de procesos celulares y se encuentra estrictamente regulada por la composición del dímero, interacción con otras proteínas y por modificaciones postraduccionales.

En el caso puntual de c-Fos, la fosforilación de su dominio C-terminal por ERK 1/2 constituye un paso crucial en el aumento de la actividad transcripcional (Whitmarsh, 2007).

Para evaluar los efectos de las FKBP5s sobre la actividad transcripcional de AP-1 realizamos ensayos de genes reporteros, bajo el estímulo de PMA en células HEK-293T y BeWo.

En condiciones de sobreexpresión de FKBP52, observamos que la actividad transcripcional de AP-1 incrementa significativamente tanto en células BeWo

como en células HEK-293T. En este último tipo celular, la regulación de la actividad transcripcional de AP-1 mediada por FKBP52 resultó dependiente del estímulo y la concentración de plásmido pCI-Neo-hFKBP52 transfectado (Figura 38).

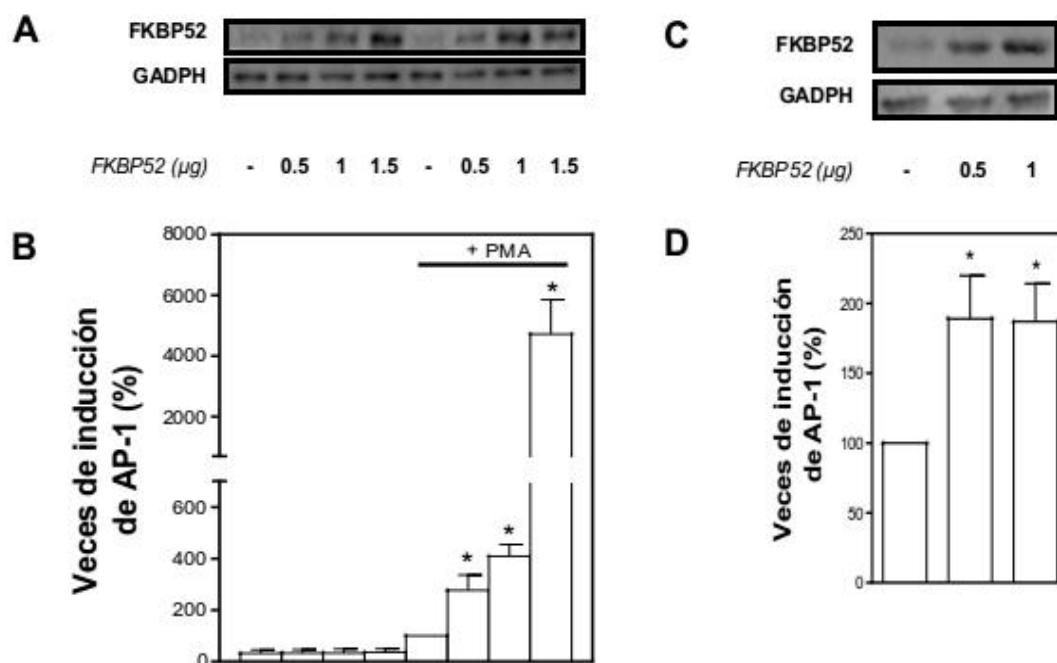


Figura 38. FKBP52 incrementa la actividad transcripcional de AP-1

Análisis de los niveles de proteína FKBP52 de células HEK-293T (A) o BeWo (C) transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-hFKBP52 (0.5 - 1.5 µg), y luego tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 h.

La actividad transcripcional de células HEK-293T (B) o BeWo (D) fueron evaluadas mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 6 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa. D) Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), B-D) los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales sujetas a la inducción con PMA con respecto al grupo control estimulado, determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

La sobreexpresión de las mutantes puntuales de FKBP52 (FKBP52 F67Y y FKBP52 F130Y) inhibe la acción de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de AP-1. Estas observaciones sugieren que la regulación transcripcional mediada por FKBP52 sería dependiente de la actividad enzimática de su dominio PPIasa en ambas líneas celulares.

Por ensayos de competencia, los efectos de las mutantes puntuales de FKBP52 fueron revertidos parcialmente por cotransfección de la proteína FKBP52 salvaje en células HEK-293T (Figura 39).

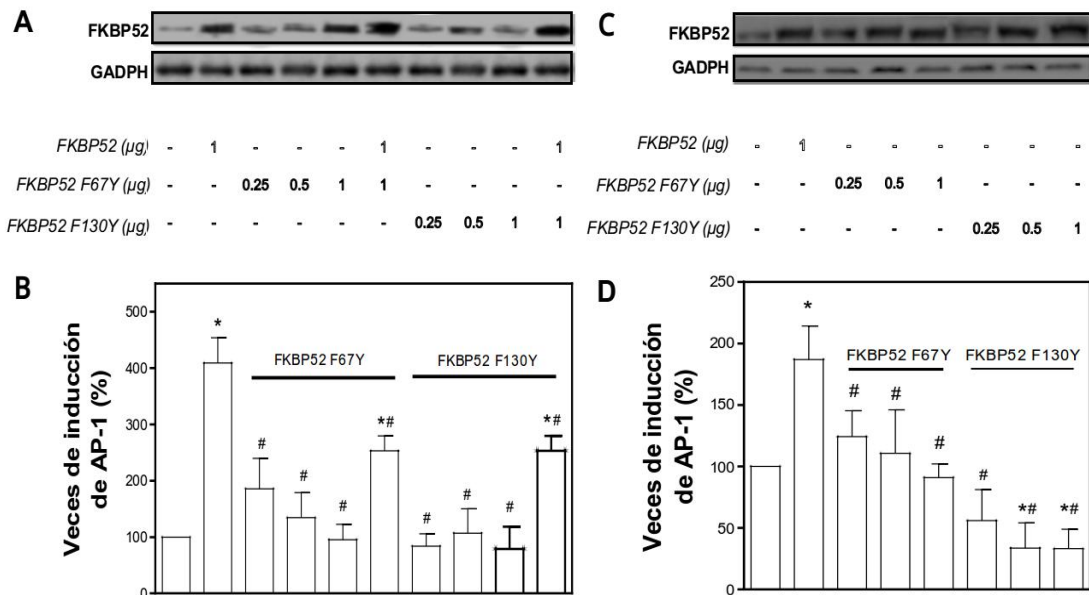


Figura 39. FKBP52 modula la actividad transcripcional de AP-1 de manera dependiente de su actividad PPIasa en líneas celulares HEK-293T y BeWo

Análisis de los niveles de proteína FKBP52 de células HEK-293T (A) o BeWo (C) transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-hFKBP52 (1 μg), pCI-Neo-hFKBP52 F67Y (0.25-1 μg) y/o pCI-Neo-hFKBP52 F130Y (0.25-1 μg), y luego tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 h.

La actividad transcripcional de células HEK-293T (B) o BeWo (D) fueron evaluadas mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 6 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre las diferentes condiciones determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52.

Al igual que la mutante FKBP52 F130Y, la sobreexpresión de la mutante del dominio TPR de FKBP52 (FKBP52 K354A) disminuye significativamente la actividad transcripcional de AP-1 mediado por FKBP52. Estas evidencias sugieren que la actividad transcripcional de AP-1 modulada por FKBP52 no solo estaría condicionada por la actividad enzimática del dominio PPIasa (cuya

participación ha resultado significativamente activa en varios de los procesos ya descritos) sino también por su dominio TPR (Figura 40).

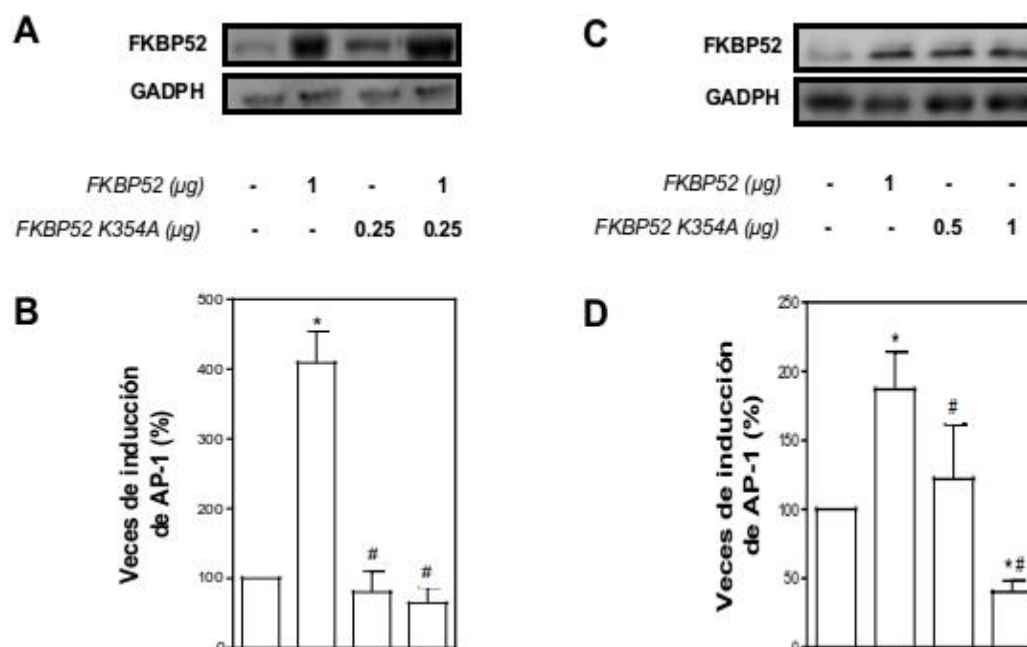


Figura 40. FKBP52 modula la actividad transcripcional de AP-1 de manera dependiente de su dominio TPR en las líneas celulares HEK-293T y BeWo

Análisis de los niveles de proteína FKBP52 de células HEK-293T (A) o BeWo (C) transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-hFKBP52 (1 μ g) o pCI-Neo-hFKBP52 K354A (0.25-1 μ g), y luego tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 h. La actividad transcripcional de células HEK-293T (B) o BeWo (D) fueron evaluadas mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 6 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio \pm desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β -galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre las diferentes condiciones determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52.

El siguiente paso fue analizar la modulación de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de AP-1. En condiciones de sobreexpresión de FKBP51, observamos que la actividad transcripcional de AP-1 disminuyó significativamente de manera dependiente de la concentración de plásmido pCI-Neo-Flag-hFKBP51 transfectado en ambas líneas celulares (Figura 41).

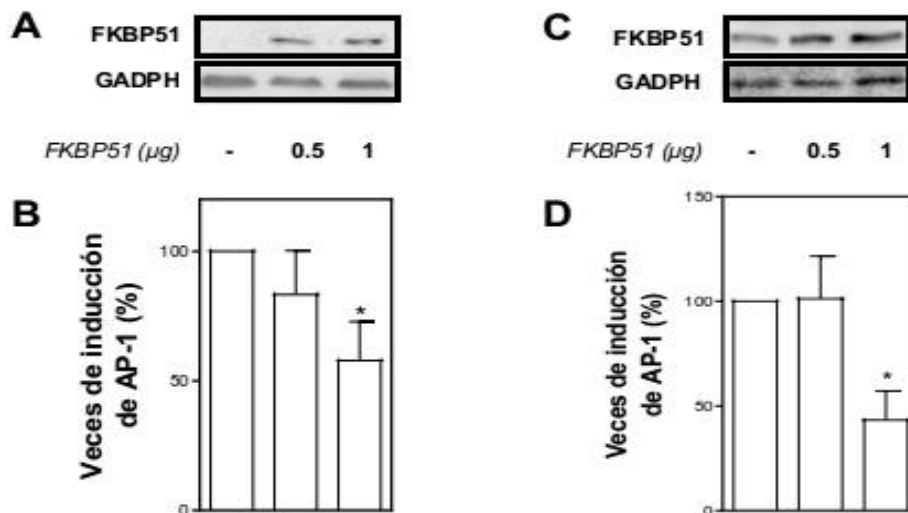


Figura 41. FKBP51 inhibe la actividad transcripcional de AP-1 en función de la concentración de plásmido transfectada en las líneas celulares HEK-293T y BeWo

Análisis de los niveles de proteína FKBP51 de células HEK-293T (A) o BeWo (C) transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 (0.5-1 µg), y luego tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 h.

La actividad transcripcional de células HEK-293T (B) o BeWo (D) fueron evaluadas mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 6 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio \pm desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de Luciferasa / β -galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control estimulado con PMA, determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

En similitud con FKBP52, el dominio PPlasa de FKBP51 tendría un papel fundamental en la regulación de la actividad transcripcional de AP-1 mediada por FKBP51. La sobreexpresión de la mutante FKBP51 FD67/68DV no solo provoca la pérdida del efecto inhibitorio de FKBP51 en células BeWo sino también el incremento de la actividad transcripcional de AP-1 en células HEK-293T (Figura 42).

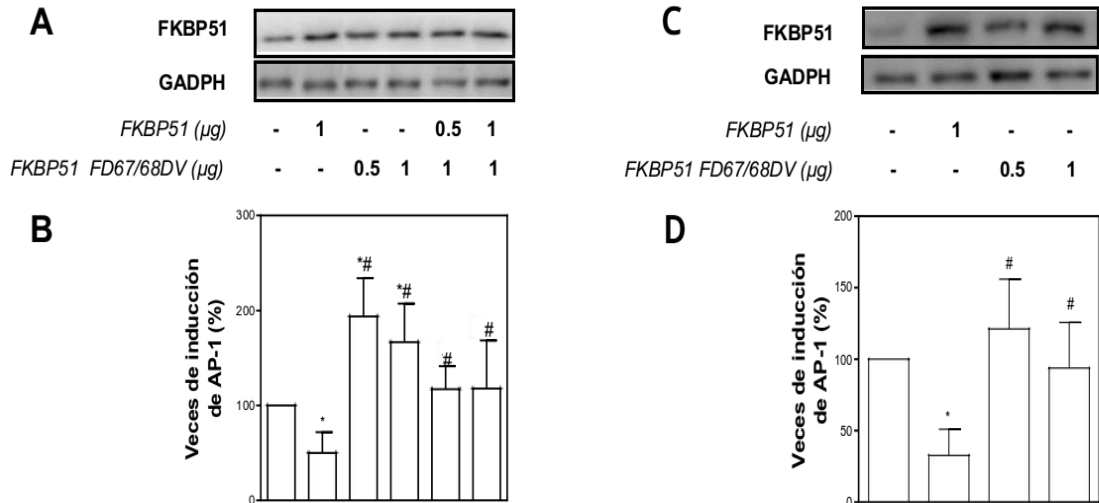


Figura 42. FKBP51 modula la actividad transcripcional de AP-1 de manera dependiente de su actividad PPIasa en las líneas celulares HEK-293T y BeWo

Análisis de los niveles de proteína FKBP51 de células HEK-293T (A) o BeWo (C) transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-Flag-hFKBP51 (0.5-1 μ g) o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV (0.5-1 μ g), y luego tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 h.

La actividad transcripcional de células HEK-293T (B) o BeWo (D) fueron evaluadas mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 6 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio \pm desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β -galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre las distintas condiciones determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP51.

Curiosamente, si se cotransfectan ambas FKBP51 salvajes, se observa un antagonismo funcional dependiente de la relación de concentraciones de plásmidos codificantes para ambas FKBP51 (Figura 43).

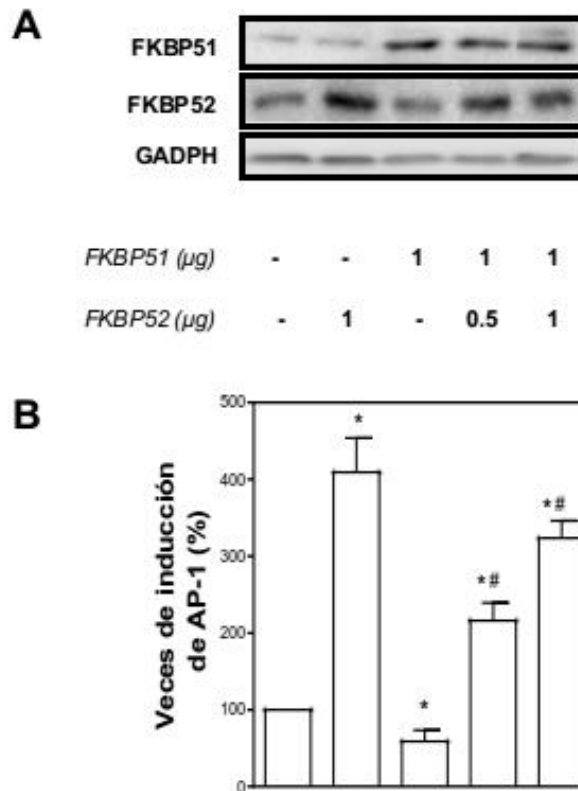


Figura 43. FKBP51 y FKBP52 tienen funciones antagónicas en la regulación sobre la actividad transcripcional de AP-1

Análisis de los niveles de proteína FKBP51 y FKBP52 de células HEK-293T (A) transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-Flag-hFKBP51 (1 μg) o pCI-Neo-hFKBP52 (0.5-1 μg), y luego tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 h.

La actividad transcripcional de células HEK-293T (B) fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio \pm desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β -galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*), el numeral (#) y la letra griega φ indican diferencias significativas entre condiciones determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA, el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52 y la letra griega φ usa de patrón al grupo FKBP51.

Con el objetivo de verificar que la modulación de las FKBP5s sobre la actividad transcripcional de AP-1 no es estímulo específica, ampliamos ensayos de genes reporteros empleando dos estímulos diferentes: IL-1 β y TBOOH.

En células HEK-293T, observamos que mayores niveles de FKBP52 se corresponden a un aumento significativo de la actividad transcripcional de AP-1 bajo el estímulo de IL-1 β y TBOOH (Figura 44).

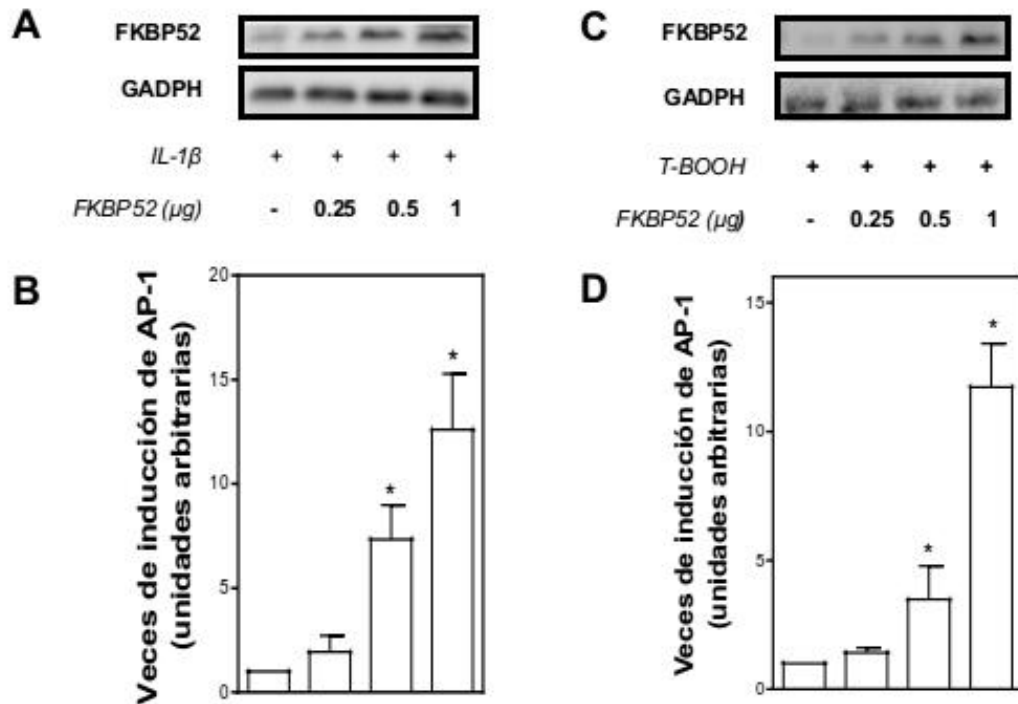


Figura 44. FKBP52 incrementa la actividad transcripcional de AP-1 no solo bajo el estímulo de PMA, sino también de IL-1β o TBOOH en la línea celular HEK-293T

Análisis de los niveles de proteína FKBP52 de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-hFKBP52 (0.25-1 µg), y luego tratadas con IL-1β (1.5 ng/ml, A) durante 6 h o TBOOH (50 µM, B) durante 0.5 h. La actividad transcripcional de células HEK-293T, tratadas con IL-1β (C) o TBOOH (D) fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con el estímulo específico (cuyo valor arbitrario corresponde al 1). El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control estimulado, determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

En base a los resultados descritos, se puede afirmar que las FKBP5s modulan la actividad transcripcional de AP-1 de forma antagónica; mientras que FKBP52 estimula, la FKBP51 inhibe. Además demostramos que los efectos de las INMs dependen de la actividad enzimática de su dominio PPIasa, y en el caso particular de FKBP52, también del dominio TPR. Por último, observamos que ausencia de estímulo, FKBP52 no es capaz de inducir un incremento de la actividad transcripcional de AP-1.

1.7. C-Fos interacciona con las FKBP

La interacción de c-Fos con otros miembros de la familia AP-1, con otros factores de transcripción u otras proteínas diversifican el rango de acción en la regulación de procesos celulares, además de potenciar su efecto biológico. Estas interacciones proteína-proteína pueden activar o reprimir la actividad de AP-1. La lámina A/C es un claro ejemplo de una interacción con efectos represivos. Es así que la lámina A/C secuestra a c-Fos en el anillo perinuclear, disminuyendo la actividad de AP-1 y la proliferación celular (Ivorra, 2006). Este proceso es reversible, controlado por estímulos mitogénicos por medio de la señalización dependiente de ERK 1/2 (Gonzalez, 2008).

Avanzando con nuestro razonamiento, nos preguntamos si las INMs interaccionan con c-Fos formando complejos. En este marco, decidimos evaluar la interacción c-Fos y las FKBP (endógenas) mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación seguido de un WB. Para ello, se emplearon lisados totales de células BeWo previamente inducidas con PMA (100 ng/ml) durante 90 min. Dichos lisados se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-c-Fos y el material inmunoprecipitado se analizó por WB.

En la Figura 45, se demuestra que las FKBP interaccionan con la proteína c-Fos en respuesta al tratamiento con PMA. De donde resulta que ambas FKBP interaccionan con c-Fos en ausencia de estímulo y tras la inducción con PMA, solo FKBP52 es capaz de interaccionar con dicho factor de transcripción.

La presencia de las chaperonas en la fracción del lisado inmunoprecipitado estimulado con PMA (Hsp70 y Hsp90) nos aporta tres datos interesantes: en primer lugar que, FKBP52 y Hsp90 podrían estar formando un heterocomplejo con c-Fos y en segundo lugar que, la co-inmunoprecipitación de Hsp90 podría explicar la inhibición de la actividad transcripcional de AP-1 mediada por FKBP52 K354A.

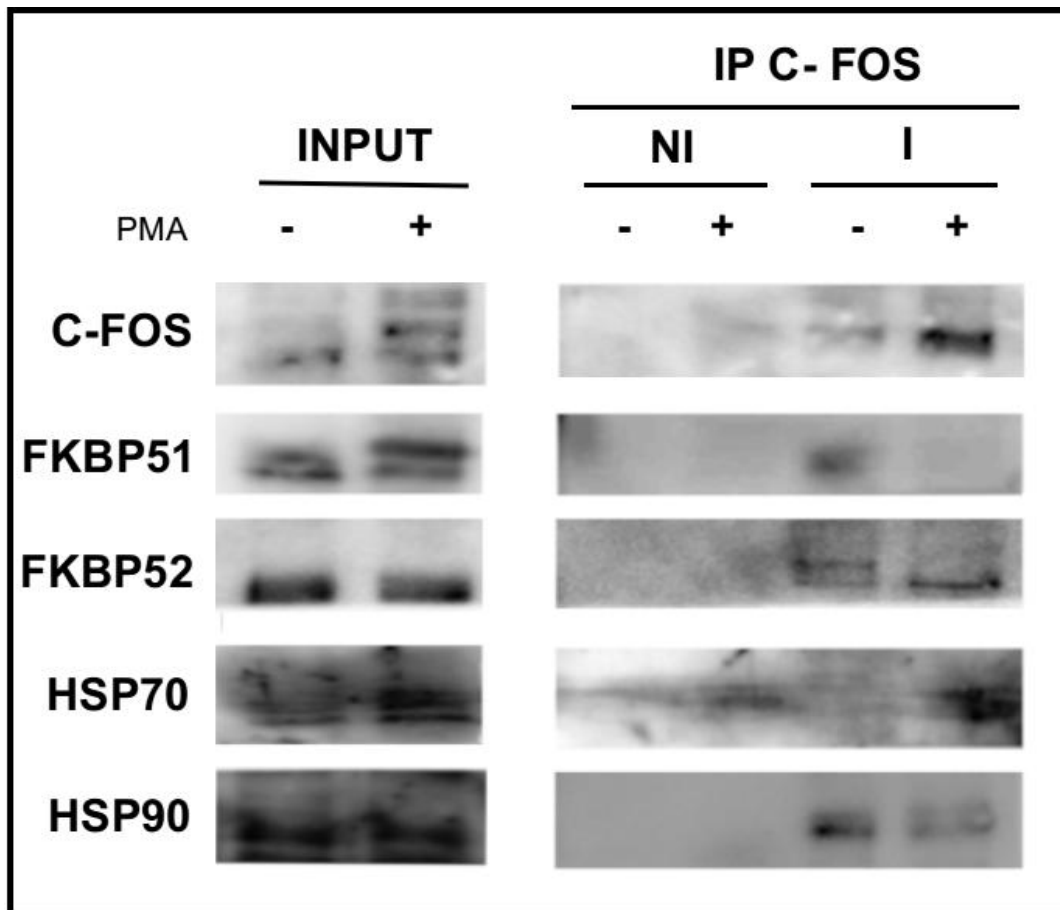


Figura 45. C-Fos interacciona con las FKBP5 en células BeWo

Co-inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-c-Fos (I) o IgG de ratón (NI) de lisados de células BeWo deprivadas 24 h de suero y posteriormente, incubadas con (+) o sin (-) PMA (100 ng/ ml) durante 90 min. Las proteínas co-inmunoprecipitadas se analizaron por WB, utilizando los anticuerpos anti-c-Fos, anti-FKBP51, anti-FKBP52, anti-Hsp70 y anti-Hsp90. En el panel izquierdo se muestran 1/10 de los lisados totales de células BeWo (INPUT) mientras que en el panel derecho, figuran las proteínas co-inmunoprecipitadas.

Poco está descrito acerca de la relación funcional existente entre AP-1 y Hsp90. Hasta el momento, se sabe que inhibidores específicos de Hsp90 (geldanamicina, radicicol o herbimicina) inhiben la actividad transcripcional de AP-1 mediada por estímulos inflamatorios, alterando en casos particulares los niveles de c-Fos (Murata, 2005). Asimismo, se observó que la inhibición de Hsp90 favorece la ubiquitinización y consecuente, degradación de ERK 5 (coactivador de AP-1). En concreto, se demostró que, en ausencia de estímulo, ERK 5 interacciona con Hsp90. Al activarse la quinasa se disocia del complejo y transloca al núcleo, donde fosforila a sus proteínas blancas (Gomez, 2016).

En tercer lugar también podemos mencionar que, la co-inmunoprecipitación de Hsp70 nos permitiría especular acerca de su papel regulatorio sobre el factor de transcripción AP-1. Está descrito que Hsp70 modula la afinidad de unión de AP-1 al ADN mediante un mecanismo aparentemente independiente de la fosforilación y reacciones redox. En efecto, contribuye al ensamblado de dímeros de AP-1, atenuando la formación particular del heterodímero c-Fos/c-Jun (Carter, 1997).

1.8. Efectos de FKBP52 sobre la unión de AP-1 a sus sitios blancos de ADN

El último paso que se planteó en la caracterización del mecanismo regulatorio de las FKBP52 sobre la vía de señalización de AP-1 fue estudiar si la interacción de c-Fos y FKBP52 podría involucrar un mecanismo por medio del cual esta INM modulase la unión de los factores AP-1 al ADN.

Como se ha detallado previamente en la Introducción, la unión de los factores de transcripción AP-1 al ADN se ve afectada por uniones proteína-proteína. Más aún, está reportado que la activación prolongada de ERK 1/2 determina que la unión de AP-1 al ADN sea de mayor duración (Chalmers, 2007). Dado que FKBP52 favorece una activación sostenida de ERK 1/2, decidimos estudiar el posible efecto de FKBP52 sobre la unión de los factores de transcripción AP-1 a secuencias de ADN dianas mediante ensayos de EMSA.

Esta técnica se llevó a cabo utilizando como sonda un oligonucleótido de doble cadena correspondiente a una secuencia consenso de reconocimiento de los factores de transcripción AP-1. En la Figura 46 se determinó la zona de migración del gel donde se encuentra el complejo específico de AP-1. Para ello, la mezcla de la sonda de AP-1 biotinilada y extractos nucleares (procedentes de células BeWo inducidas con PMA) se incubaron con las sondas competidoras no biotiniladas o anticuerpo anti c-Fos.

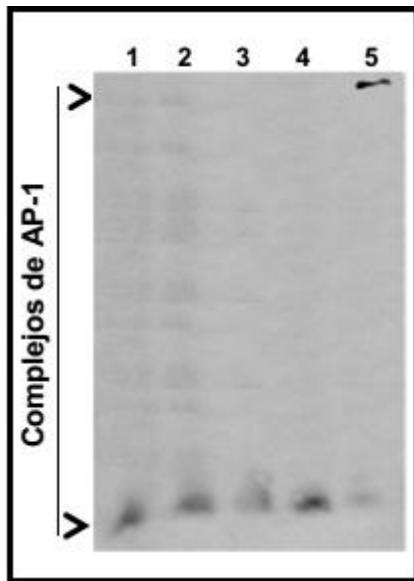


Figura 46. Ensayo de competencia para verificar la especificidad de unión entre las proteínas presentes en el extracto nuclear y la secuencia consenso de ADN de AP-1

Células BeWo se privaron de suero durante 24 h y luego, se indujeron con PMA (100 ng/ml) durante 90 min. Por fraccionamiento subcelular, se obtuvo la fracción nuclear. Las fracciones nucleares (10 µg) se incubaron directamente con la sonda de AP-1 biotinilada (25 fmol) [1] o se preincubaron con sondas competidoras no biotiniladas, tales como la secuencia consenso de NF-kappaB (200 fmol) [2] o de AP-1 (200 fmol) [3], suero no inmune [4] o anticuerpo anti-c-Fos (0,4 µg) [5].

Una vez efectuado el análisis de migración electroforética del complejo específico de AP-1, proseguimos a evaluar la modulación de FKBP52 sobre la unión de AP-1 al ADN. Para ello, realizamos dos experimentos paralelos:

En primer lugar, utilizando extractos nucleares correspondientes a células BeWo inducidas con PMA, realizamos una incubación con proteína purificada FKBP52-GST o GST solo. En tal caso, observamos que la incubación de los extractos nucleares con la proteína FKBP52-GST ocasionó la aparición de una nueva marca de movilidad electroforética menor que el complejo AP-1 específico previamente observado. La presencia de esta nueva marca retardada sugiere la formación de otro complejo de AP-1 capaz de unirse a la secuencia consenso de dicho factor de transcripción (Figura 47).

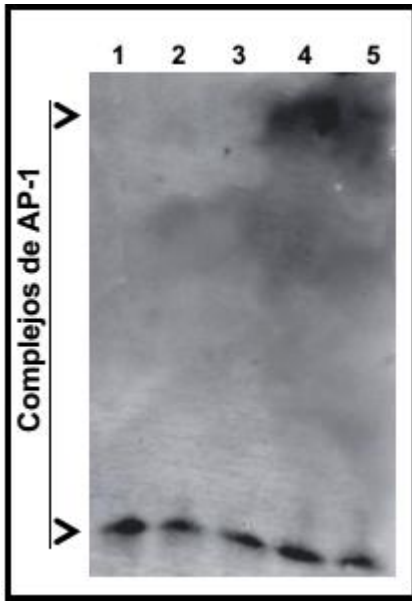


Figura 47. Efecto de FKBP52 en la unión de AP-1 al ADN, en extractos nucleares de células BeWo preincubados con proteína FKBP52-GST o GST

Células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-hFKBP52 se privaron de suero durante 24 h y luego, se indujeron con PMA (100 ng/ml) durante 90 min. Por fraccionamiento subcelular, se obtuvo la fracción nuclear.

Las fracciones nucleares (10 µg) se incubaron directamente con la sonda de AP-1 biotinilada (25 fmol) [1] o se preincubaron con proteína purificada GST (0,4 µg [2] - 0,8 µg [3]) o FKBP52-GST (0,4 µg [4] - 0,8 µg [5]).

En segundo lugar, empleamos extractos nucleares procedentes de células BeWo previamente transfectadas con el plásmido control o codificante para FKBP52, y posteriormente inducidas con PMA a distintos tiempos. Los resultados de este experimento no solo demostraron un incremento de la unión de AP-1 al ADN para aquellos extractos nucleares correspondientes a las células que sobreexpresaban FKBP52, sino también un efecto positivo de unión de AP-1 al ADN persistente en el tiempo (Figura 48).

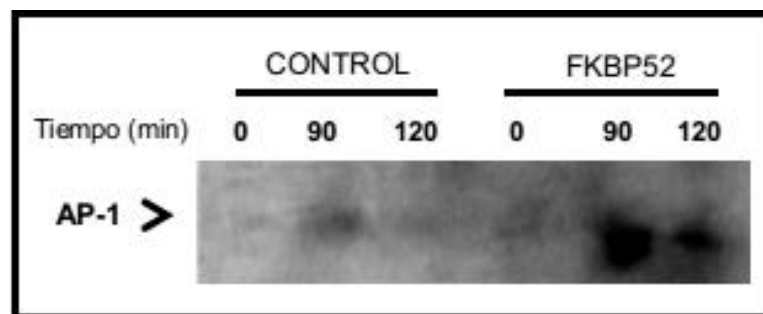


Figura 48. Efecto de FKBP52 en la unión de AP-1 al ADN, en extractos nucleares de células BeWo transfectadas con el plásmido codificante de FKBP52

Células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-hFKBP52 se privaron de suero durante 24 h y luego, se trataron con PMA (100 ng/ml) o vehículo durante 90-120 min. Por fraccionamiento subcelular, se obtuvo la fracción nuclear. Las fracciones nucleares (10 µg) se incubaron con la sonda de AP-1 biotinilada (25 fmol).

Finalmente, analizamos si el efecto positivo de FKBP52 sobre la unión de AP-1 a su secuencia de consenso de ADN era el resultado de la contribución funcional de la actividad enzimática de su dominio PPIasa. En virtud de ello, comparamos la capacidad de unión de AP-1 al ADN en condiciones de sobreexpresión de FKBP52 o FKBP52 F130Y. Para tal fin, se incubó la sonda de AP-1 biotinilada con extractos nucleares procedentes de células BeWo que sobreexpresaban FKBP52 o bien FKBP52 F130Y y las cuales además, fueron sujetas al tratamiento con PMA o vehículo durante 120 min. En tal caso, observamos que la sobreexpresión de FKBP52 F130Y desfavorecía el incremento sostenido de unión de AP-1 al ADN mediado por FKBP52 (Figura 49).

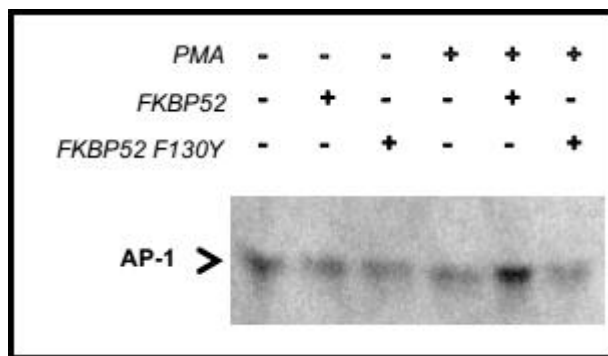


Figura 49. Efecto de FKBP52 en la unión de AP-1 al ADN, en extractos nucleares de células BeWo transfectadas con el plásmido codificante de FKBP52 F130Y

Células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-hFKBP52 o pCI-Neo-hFKBP52 F130Y se privaron de suero durante 24 h y luego, se trataron con PMA (100 ng/ml) o vehículo durante 120 min. Por fraccionamiento subcelular, se obtuvo la fracción nuclear. Las fracciones nucleares (10 µg) se incubó con la sonda de AP-1 biotinilado (25 fmol).

Las evidencias experimentales de este apartado nos permiten resaltar que FKBP52 ejerce una regulación positiva sobre la unión de AP-1 al ADN, dependiente de la actividad enzimática de su dominio PPIasa.

2. Efectos biológicos de la regulación de las FKBP5s sobre AP-1 y NF- κ B

2.1. Estudio de las funciones biológicas de AP-1 reguladas por FKBP5s en células BeWo.

La implantación embrionaria es crítica para la reproducción de mamíferos y requiere de una correcta preparación del útero (receptividad uterina). Este proceso comprende una ventana temporal finamente regulada por las hormonas esteroides. En particular, la progesterona (P4) participa en todos los estadios del embarazo, incluyendo ovulación, fertilización, implantación, decidualización y mantenimiento del embarazo. La P4 ejerce su acción en los tejidos vía el receptor de progesterona (PR). El modelo murino FKBP52 (-/-) permitió develar el rol crítico de FKBP52 en la implantación uterina debido a que su ausencia generó resistencia a la progesterona, causando fallas en el proceso de implantación embrionaria y en la decidualización (Cox, 2007; Tranguch, 2005). Más aún, se ha reportado que la deficiencia en FKBP52 estaría asociada a la patogénesis de abortos espontáneos recurrentes, endometriosis, preeclampsia y restricción del crecimiento intrauterino (Hirota, 2008; Acan, 2015; Chen, 2015). Todos estos antecedentes indican que la proteína FKBP52 tendría una participación destacada en el proceso de placentación.

De manera análoga, miembros de la familia de AP-1 se expresan en placentas normales y patológicas regulando diferentes procesos celulares: proliferación, migración, invasión y diferenciación (Bamberger, 2004; Marziani, 2010).

En este contexto y contemplando la capacidad de FKBP de modular la vía de señalización de AP-1, nos pareció interesante abordar el estudio de la regulación de las funciones biológicas de AP-1 por FKBP en un modelo de células trofoblásticas humanas.

En el abordaje del estudio de la implantación humana, los límites éticos y la limitada disponibilidad de tejido placentario dificultan los avances en esta área. En este sentido, la mayor parte del conocimiento proviene de experimentos *in vitro* utilizando cultivos primarios del tercer trimestre o líneas celulares trofoblásticas. Dentro de la variedad de líneas celulares de tipo trofoblásticas, las células BeWo son una de las más utilizadas. La línea celular BeWo deriva de una metástasis cerebral originaria de un coriocarcinoma, posteriormente transplantada post-parto a la mejilla de un hámster. Tras transferencias seriadas durante 8 años, la línea celular BeWo se estableció en cultivo (Patillo, 1968). El crecimiento de células BeWo en cultivo permitió distinguir dos tipos de células: mayoritariamente, citotrofbastos y células gigantes multinucleares, con apariencia de sinciotrofblasto (Grümmer, 1990).

Por su similitud estructural y funcional a las células trofoblásticas, la línea celular BeWo se considera un modelo validado para el estudio de funciones celulares, transporte y metabolismo (Patillo, 1968; Grümmer, 1990; Grümmer, 1994; Liu, 1997).

2.2. Efectos de FKBP sobre MMPS e IL-6

La última etapa de la implantación embrionaria es la invasión trofoblástica. Durante este proceso, un subgrupo de células trofoblásticas (el trofblasto extraveloso) invade la decidua y remodela las arteriolas espiraladas uterinas conformando la red vascular materno-fetal.

Las MMPs y citoquinas constituyen dos factores críticos en el proceso de remodelación de la MEC y vascularización de la interfase materno-placentaria.

En primer lugar, centraremos la atención sobre las MMPs. Desde el punto de vista de la modulación transcripcional, Vincenti y colaboradores (2011) describieron que la región promotora de varios genes de MMPs se encontraban altamente conservada y contaban con sitios proximales de unión a AP-1 y NF-kappaB. En contraste, estos autores sostenían que MMP-2 y MMP-14 carecían de estos sitios proximales. Avanzado el siglo XXI, se afirmaba que la MMP-2 tenía una expresión constitutiva, independiente de estímulos extracelulares (Vincenti, 2001). Estudios ulteriores demostraron la existencia de un sitio de AP-1 proximal en el promotor del gen MMP-2 de células cardíacas de rata y células humanas de mama (Bergman, 2003; Song, 2006). Estas evidencias contribuyeron a fortalecer la noción de que MMP-2 está transcripcionalmente regulado por AP-1.

De manera similar, existen estudios que señalan que los TIMPs y MMP-14 estarían sujetos a la regulación de AP-1 y NF-kappaB (Clark, 2008; Vicent, 2015; Li, 2016).

A nivel de placenta, las MMP-2 y MMP-9 determinan el comportamiento invasivo del citotrofoblasto extraveloso. La disminución de la expresión de ambas MMPs, la cual es característica del segundo y tercer trimestre, se refleja en un comportamiento menos invasivo de la placenta a término (Shimonovitz, 1994; Suman, 2012)

Consistentemente a estas observaciones, se ha reportado bajos niveles de expresión de la MMP-9 en placentas preeclámpticas. Varios estudios señalan que alteraciones en la expresión de MMPs podrían estar relacionado a una deficiente remodelación de la vasculatura de la decidua materna (Shokry, 2009; Omran, 2011).

Partiendo de los antecedentes anteriores, nos planteamos estudiar la regulación funcional de las MMP-2 y MMP-9 en condiciones de sobreexpresión

de FKBP. Para ello, analizamos dos parámetros que influyen en la actividad biológica de las MMPs: los niveles de proteína endógenos y la actividad proteolítica de las MMP-2 activa *per se*.

En primera instancia, se evaluó si el estímulo PMA era capaz de inducir cambios en los niveles de las proteínas MMP-2 y MMP-9 durante las 24 h y 48 h de tratamiento. Tal como se observa en la Figura 50, PMA incrementó los niveles de las MMPs tanto a las 24 h como a las 48 h de estimulación.

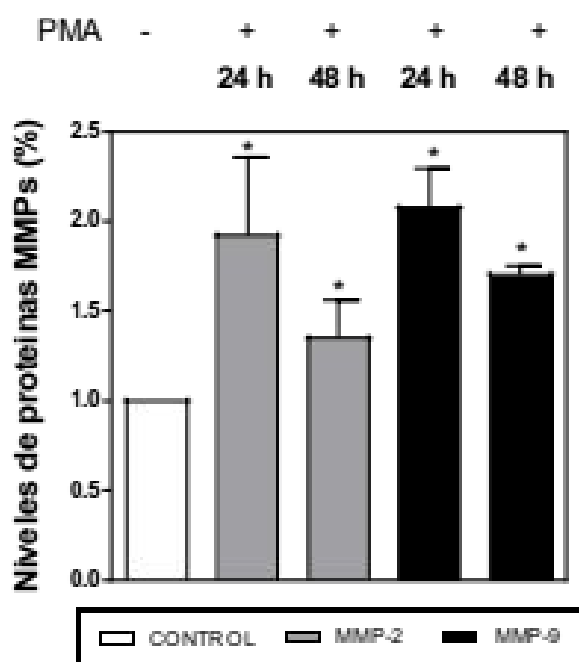


Figura 50. Efecto PMA sobre los niveles endógenos de proteínas MMPs

Células BeWo se inducen con PMA (100 ng/ml) durante 24 h o 48 h, tras una privación previa de SFB.

Densitometría de los niveles endógenos de proteínas MMP-2 (columnas grises) y MMP-9 (columnas negras). Los resultados se expresan como el porcentaje de los niveles de proteínas MMPs (promedio \pm desvío estándar). Los valores se normalizan al valor promedio del grupo control no inducido con PMA (columna blanca, valor arbitrario = 100 %). Estos resultados son representativos de 3 ensayos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el grupo control (vehículo), determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$).

Paso siguiente, analizamos los niveles endógenos de las proteínas MMP-2 y MMP-9 en condiciones de sobreexpresión de FKBP52 y bajo la inducción de PMA durante 24 h (Figura 51). En tal caso, observamos que la sobreexpresión de FKBP52 genera un incremento significativo de los niveles de MMP-2 y MMP-9.

Esta modulación positiva de FKBP52 se inhibió frente la sobreexpresión de FKBP52 F130Y o la pre-incubación con FK506, alcanzándose valores similares al control inducido con PMA.

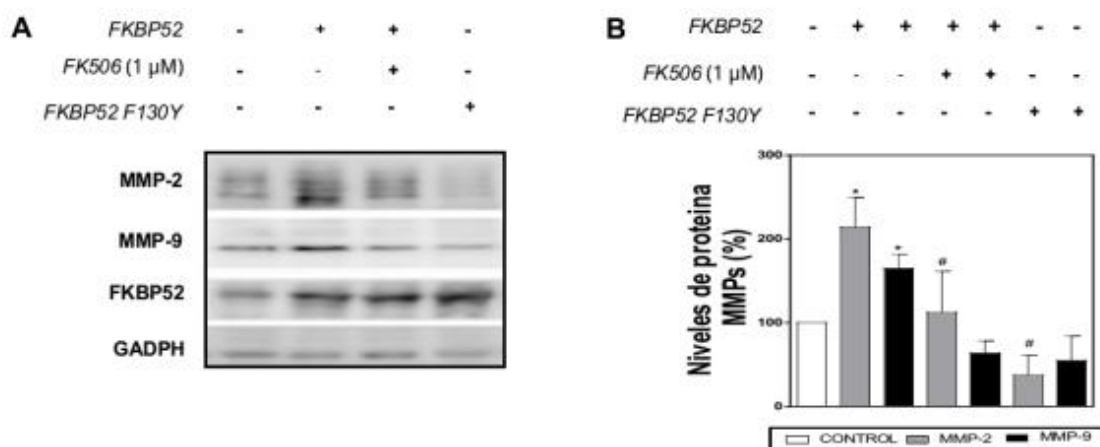


Figura 51. Efectos de FKBP52 sobre los niveles endógenos de proteínas MMP-2 y MMP-9

A. Análisis de los niveles endógenos de proteínas MMP-2 y MMP-9 en células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-hFKBP52 o pCI-Neo-hFKBP52 F130Y. Tras una previa privación de SFB, se realizó una inducción con PMA (100 ng/ml) durante 24 h.

B. Densitometría de los niveles endógenos de proteínas MMP-2 (columnas grises) y MMP-9 (columnas negras). Los resultados se expresan como el porcentaje de los niveles de proteínas MMPs (promedio \pm desvío estándar). Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (columna blanca, valor arbitrario = 100%). Estos resultados son representativos de 3 ensayos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara una condición dada con el grupo control inducido con PMA mientras que el numeral (#) o phi (ϕ) toma de referencia al grupo FKBP52, correspondiente a los niveles de proteínas MMP-2 y MMP-9 respectivamente.

Por otro lado, la sobreexpresión de FKBP51 causó una disminución significativa de los niveles de la proteína MMP-2 tras 48 h de inducción con PMA (Figura 52). En el caso concreto de la proteína MMP-9, no se encontraron diferencias significativas con el grupo control al sobreexpresar FKBP51.

Al evaluar los efectos de la contribución del dominio PPlasa de FKBP51, no observamos cambios significativos en los niveles de la proteína MMP-2 y MMP-9 con respecto a la condición de FKBP51 salvaje, tanto cuando sobreexpresamos

la mutante FKBP51 FD67/68DV o cuando preincubamos las células BeWo con el inhibidor FK506 (Figura 52).

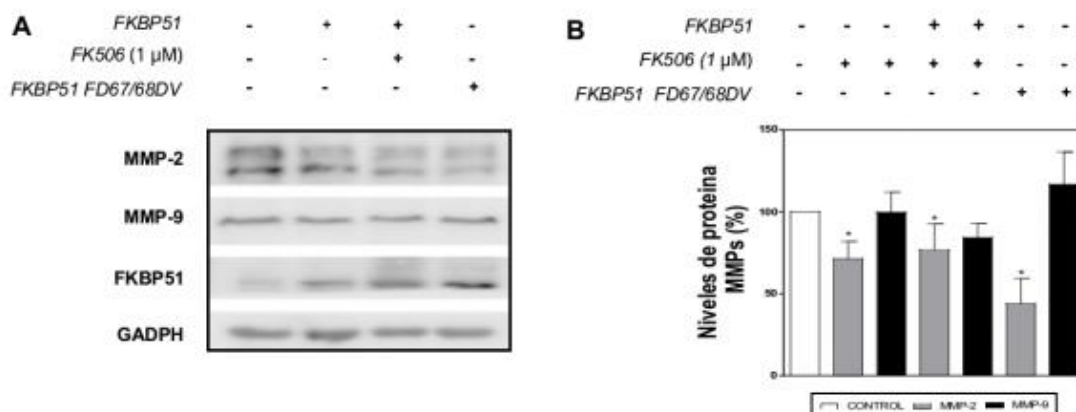


Figura 52. Efectos de FKBP51 sobre los niveles endógenos de proteínas MMP-2 y MMP-9

A. Análisis de los niveles endógenos de proteínas MMP-2 y MMP-9 de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-Flag-hFKBP51 o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV. Tras una previa privación de SFB, se realizó una inducción con PMA (100 ng/ml) durante 48 h.

B. Densitometría de los niveles endógenos de proteínas MMP-2 y MMP-9 de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-Flag-hFKBP51 o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV. Los resultados se expresan como el porcentaje de los niveles de proteínas MMPs (promedio \pm desvío estándar). Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (columna blanca, valor arbitrario = 100 %). Estos resultados son representativos de 3 ensayos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre una condición dada y el grupo control inducido con PMA, determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$).

En segunda instancia, se midió la degradación proteolítica de la gelatinasa MMP-2 en condiciones de sobreexpresión de FKBP52 mediante la técnica de zimografía. Para este ensayo, se emplearon los medios condicionado de células BeWo previamente inducidas con PMA durante 24 h. Tal como se observó con los niveles de la proteína MMP-2, la sobreexpresión de FKBP52 causó el aumento significativo de la actividad proteolítica de la gelatinasa y su efecto funcional resultó dependiente de la actividad enzimática de su dominio PPLasa (Figura 53).

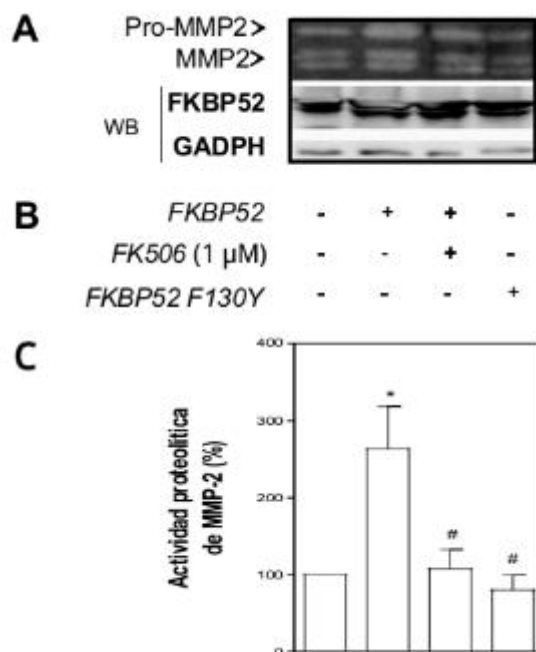


Figura 53. Efectos de FKBP52 sobre la actividad proteolítica de MMP-2

A. Análisis de las áreas de gelatina degradadas del zimograma. Las células BeWo fueron transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-hFKBP52 o pCI-Neo-hFKBP52 F130Y y tras una previa privación de SFB, se realizó una inducción con PMA (100 ng/ml) durante 24 h.

B. Análisis de los niveles de la proteína FKBP52.

C. Densitometría de las áreas de gelatina degradadas. La actividad proteolítica de MMP-2 se midió mediante la técnica de zimografía. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad proteolítica de MMP-2 (promedio \pm desvío estándar). Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (valor arbitrario = 100%). Estos resultados son representativos de 5 ensayos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara una condición dada y el grupo control inducido con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52.

En contraste, la sobreexpresión de FKBP51 produjo una disminución de la actividad degradativa de MMP-2 tras 48 h de inducción con PMA. Aunado a estos resultados, la sobreexpresión de la mutante FKBP51 FD67/68DV o la preincubación con la droga FK506 no generaron cambios significativos sobre la actividad proteolítica de MMP-2 en relación al grupo FKBP51 (Figura 54).

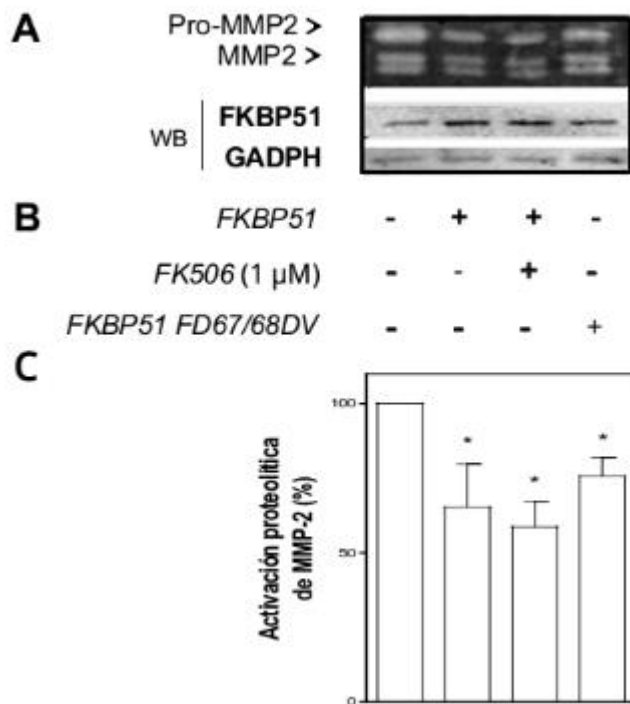


Figura 54. Efectos de FKBP51 sobre la actividad proteolítica de MMP-2

A. Análisis de las áreas de gelatina degradadas del zimograma. Las células BeWo fueron transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-NeoFlag-hFKBP51 o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV y tras una previa deprivación de SFB, se realizó una inducción con PMA (100 ng/ml) durante 48 h.

B. Análisis de los niveles de proteína FKBP51.

C. Densitometría de las áreas de gelatina degradadas. La actividad proteolítica de MMP-2 se midió mediante la técnica de zimografía. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad proteolítica de MMP-2 (promedio \pm desvío estándar). Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor se fija arbitrariamente al 100%). Estos resultados son representativos de 5 ensayos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara una condición dada y el grupo control inducido con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP51.

Como habíamos mencionado previamente, las citoquinas constituyen otro factor clave en la invasión trofoblástica.

Entre las citoquinas estudiadas, la IL-6 ha resultado hasta ahora la más controversial en la reproducción, ya que interviene tanto en procesos pro como antiinflamatorios (Chaouat, 2004). La placenta constituye la principal fuente de IL-6 durante la gestación y no es casual, pues sus funciones son necesarias en el desarrollo y mantenimiento del embarazo (Kameda, 1990). En efecto, se ha

demostrado que la IL-6 no solo interviene en la vascularización de vellosidades coriónicas, sino también en la remodelación de tejidos placentarios, modulando la expresión de metaloproteasas (Bischof, 2000). Ya hacia el final del embarazo, los niveles de ARNm de IL-6 son cuatro veces mayores que en el primer trimestre, posiblemente por el proceso proinflamatorio del pre-parto (Agarwal, 2000).

Un dato curioso es que la deficiencia de IL-6 ocasiona frecuentemente aborto recurrente (Raghupathy, 1999 ; Lim, 2000). Si bien se desconoce el mecanismo, se cree que la IL-6 regularía la transición de la respuesta inflamatoria hacia una respuesta antiinflamatoria y angiogénica. Este proceso resulta indispensable para que la implantación embrionaria y la vascularización placentaria tengan lugar (Gutierrez, 2004).

A nivel transcripcional, la expresión de IL-6 está predominantemente regulada por 4 sitios reguladores en cis ubicados en el promotor del gen de IL-6, con motivos de unión a NF-kappaB, CREB, C/EBP y AP-1 (Beetz, 2000; Hungness, 2010; Spooren, 2010). La función que cumple cada uno de estos sitios es compleja y depende del tipo celular. Según el estudio Fujisawa (2000), el éster de forbol TPA induce la expresión de IL-6 en células trofoblásticas humanas BeWo.

Dicho lo anterior, se analizaron los niveles de IL-6 en el medio condicionado de células BeWo tras el tratamiento con PMA durante 24 h y 48 h (Figura 55). En virtud que PMA indujo un aumento de los niveles de IL-6, se procedió a evaluar que ocurría con este parámetro en condiciones de sobreexpresión de FKBP.

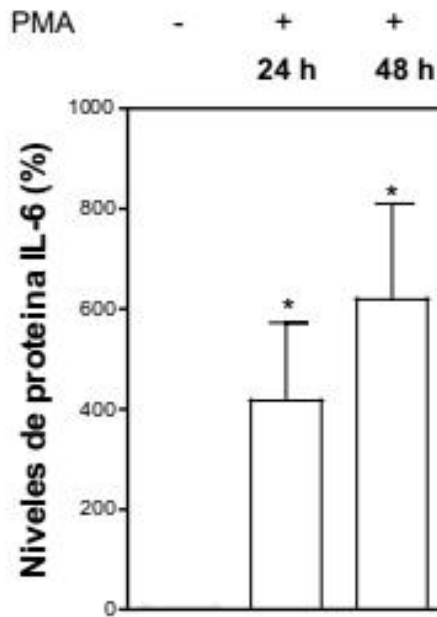


Figura 55. PMA induce el aumento de los niveles de IL-6 en el medio condicionado de células BeWo

Células BeWo se inducen con PMA (100 ng/ml) durante 24 h o 48 h, tras una deprivación previa de SFB. Los niveles de proteína IL-6 en el medio condicionado de células BeWo se midieron mediante la técnica de ELISA. Los resultados se expresan como porcentaje de los niveles de proteína IL-6 (promedio \pm desvío estándar), normalizados al valor promedio del grupo control (vehículo, cuyo valor se fija arbitrariamente a 1). Estos resultados son representativos de 5 ensayos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre una condición dada y el grupo control no inducido, determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$).

Llegado a este punto, se observaron efectos disimiles de las FKBP5s sobre los niveles de IL-6 en el medio condicionado de células BeWo. En condiciones de sobreexpresión de FKBP52, se detectó un incremento significativo de IL-6 en relación al grupo control. Esta modulación positiva de FKBP52 resultó dependiente de la actividad enzimática de su dominio PPIasa (Figura 56).

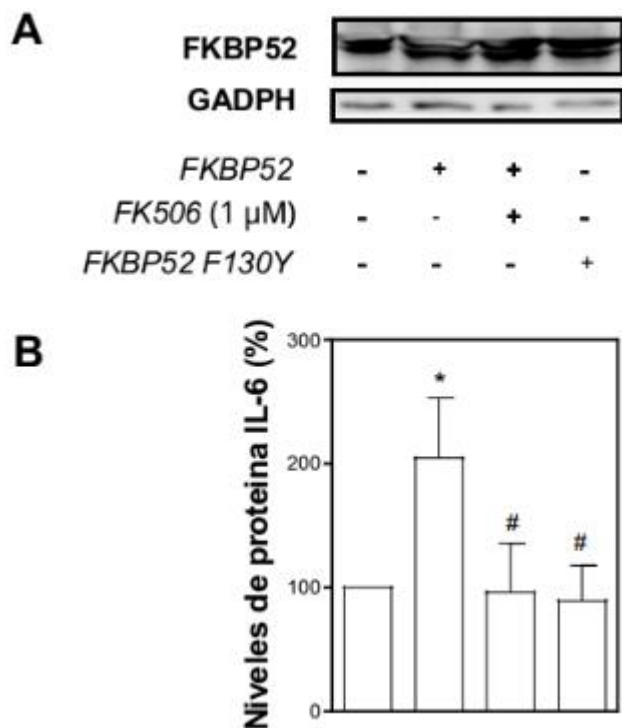


Figura 56. Efectos de FKBP52 sobre los niveles de IL-6

A. Análisis de los niveles de la proteína FKBP52 de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-hFKBP52 o pCI-Neo-hFKBP52 F130Y. Tras una previa privación de SFB, se realizó una inducción con PMA (100 ng/ml) durante 24 h.

B. Los niveles de la proteína IL-6 en el medio condicionado de células BeWo se midieron mediante la técnica de ELISA. Los resultados se expresan como el porcentaje de los niveles de IL-6 (promedio \pm desvío estándar). Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (valor arbitrario = 100 %). Estos resultados son representativos de 5 ensayos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara una condición dada y el grupo control inducido con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52.

En forma contrapuesta, FKBP51 no generó variaciones significativas en los niveles de IL-6, en comparación al grupo control inducido con PMA. Aún así, la sobreexpresión de FKBP51 FD67/68DV o la pre-incubación con FK506 reprimió significativamente la cantidad de IL-6 liberada al medio extracelular (Figura 57).

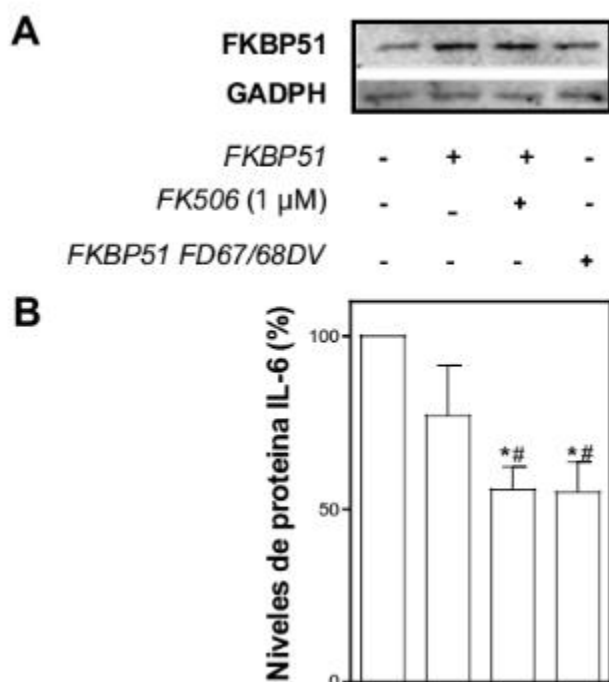


Figura 57. Efectos de FKBP51 sobre los niveles de IL-6

A. Análisis de los niveles de la proteína FKBP51 de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo, pCI-Neo-Flag-hFKBP51 o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 FD67/68DV. Tras una previa privación de SFB, se realizó una inducción con PMA (100 ng/ml) durante 24 h.

B. Los niveles de la proteína IL-6 en el medio condicionado de células BeWo se midieron mediante la técnica de ELISA. Los resultados se expresan como el porcentaje de los niveles de IL-6 (promedio \pm desvío estándar). Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (valor arbitrario = 100%). Estos resultados son representativos de 4 ensayos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara una condición dada y el grupo control inducido con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP51.

A modo de conclusión de este apartado, resaltamos el papel modulador de las FKBP5s sobre dos proteínas claves de la invasión trofoblástica.

En condiciones de sobreexpresión de FKBP52, observamos un incremento significativo de los niveles endógenos de las MMPs (MMP-2 y MMP-9) y de IL-6, como también de la actividad proteolítica de MMP-2. En todos los casos, la modulación positiva de FKBP52 resultó dependiente la actividad enzimática de su dominio PPIasa. En contraste, FKBP51 inhibió los niveles de proteína y degradación proteolítica de MMP-2 de manera independiente de la actividad enzimática de su dominio PPIasa y no afectó los niveles endógenos de la

proteína MMP-9, ni la cantidad de IL-6 en el medio condicionado. Curiosamente, la sobreexpresión de la mutante puntual del dominio PPIasa de FKBP51 o la preincubación con FK506 inhibieron los niveles de IL-6. Esta observación sugiere que la actividad PPIasa de FKBP51 interviene en la modulación positiva de los niveles de IL-6.

2.3. Efectos de FKBP51 sobre el número de células

La proliferación y la apoptosis son dos mecanismos estrechamente vinculados que influyen sobre el crecimiento y desarrollo celular.

Las primeras aproximaciones de AP-1 como modulador de la proliferación y la transformación celular surgieron de su homología con las oncoproteínas retrovirales (v-Jun y v-Fos) y su activación como respuesta a factores de crecimientos y promotores tumorales.

La capacidad de AP-1 de controlar la proliferación celular está determinada, fundamentalmente, por sus efectos sobre la expresión y función de reguladores del ciclo celular como ciclinas A, D1 y E, p53, p21^{CIP1}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} (Shaulin, 2001). Numerosos estudios han reportado el rol crucial y antagónico de los miembros de la subfamilia Jun sobre el proceso de proliferación celular; por el contrario el papel de la proteína c-Fos sobre este proceso celular aún hoy continua siendo controversial.

Mientras algunas investigaciones sostienen que c-Fos reprime la proliferación celular, otros sostienen que contribuye positivamente pero su rol sería despreciable o bien, indispensable (Dobrazanski, 1991; Pai, 1994; Balsalobre, 1995; Brusselbach, 1995; Mikula, 2003; Güller, 2008). Recientemente, se ha reportado que el silenciamiento parcial de la expresión de FOSL1 o c-Fos disminuye significativamente la proliferación de células trofoblásticas, alrededor de un 60 a 80%, respectivamente (Renaud, 2014).

En cuanto a la muerte celular, los miembros de la familia de AP-1 tienen una función dual: pueden inducir la apoptosis en algunos tipos celulares pero en otros, constituyen factores indispensables para la supervivencia celular (Hess, 2004). El rol de AP-1 sobre la apoptosis de células trofoblásticas aún no ha sido determinado.

Sobre la base de estos antecedentes y considerando la regulación negativa que ejerce FKBP51 sobre la actividad transcripcional de AP-1, analizamos si la sobreexpresión de FKBP51 tenía un efecto negativo sobre el número de células BeWo a corto plazo. Para tal fin, tras una sincronización previa de 24 h (por privación de SFB), las células BeWo se mantuvieron en condiciones óptimas de cultivo durante 72 h. Tiempo después, se contabilizaron el número de células totales de cada condición, por exclusión de captación de azul de tripán 0,4 % v/v.

En la Figura 58, se compara el número de células normalizadas (al grupo control) en función del tiempo y se observa que en condiciones de sobreexpresión transitoria de FKBP51, se logra una inhibición aproximada del 25 % crecimiento del cultivo celular.

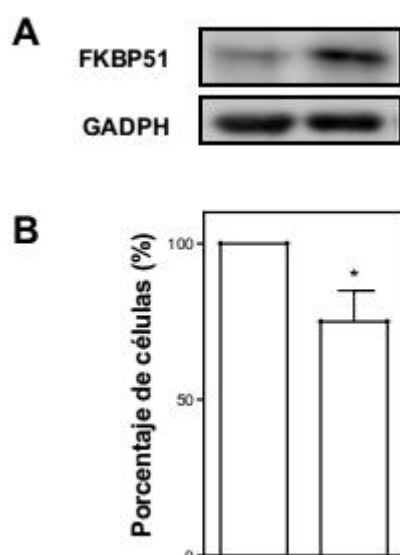


Figura 58. Efectos de FKBP51 sobre el número de células

A. Análisis de los niveles de la proteína FKBP51 de células BeWo transfectadas con el plásmido pCI-Neo o pCI-Neo-Flag-hFKBP51.

B. Tras una privación previa de SFB de 24 h, las células se mantuvieron en condiciones óptimas de cultivo durante 72 h.

El número de células contabilizó por exclusión de captación de azul del tripán 0,4% v/v. Los resultados se expresan como el porcentaje de células (promedio \pm desvío estándar), normalizados al valor promedio del grupo control inducido con PMA (valor arbitrario = 100 %). Estos resultados son representativos de 3 ensayos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre una condición dada y el grupo control, determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$).

2.4. Caracterización de clones estables de FKBP51

Con el objetivo de caracterizar la regulación de FKBP51 sobre las funciones biológicas de AP-1 y NF-kappaB en las células BeWo, se generaron clones estables bajo la selección del antibiótico G418. Se obtuvieron 3 clones estables independientes de sobreexpresión del gen *fkbp5*. Mediante ensayos de WB, se comprobó los niveles de proteína FKBP51 de los clones obtenidos (Figura 59). Como control del vector, se utilizó la misma línea celular establemente transfectada con el plásmido vacío pCI-Neo.

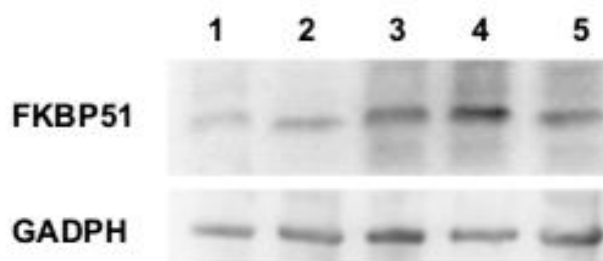


Figura 59. Perfil de los niveles de proteína FKBP51 en clones estables

Análisis de los niveles de la proteína FKBP51 de células BeWo no transfectadas (NT) [1], de un clon estable del vector vacío - Control- [2] y de clones estables de FKBP51 [3 -5].

Llegado a este punto, nos interesó examinar la actividad transcripcional de AP-1 bajo el tratamiento con PMA. De forma semejante a los resultados previos, la sobreexpresión estable de FKBP51 causó una significativa disminución de la actividad transcripcional de AP-1 en relación al clon estable del vector vacío (Figura 60).

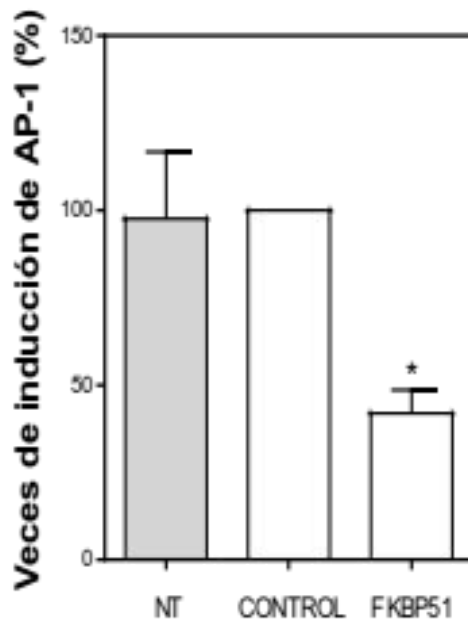


Figura 60. Efectos de la sobreexpresión estable de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de AP-1

Células BeWo no transfectadas (NT, columna gris) y clones estables (Control y de FKBP51) se inducieron con PMA (100 ng/ml) durante 6 h. La actividad transcripcional fue evaluada mediante un ensayo de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio \pm desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β -galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del clon estable Control (cuyo valor se fija arbitrariamente al 100%). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre una condición dada y el clon estable Control, determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$).

A continuación, nos preguntamos si los cambios a nivel transcripcional de AP-1 mediados por FKBP51 tendrían efecto sobre los niveles y actividad biológica de proteínas codificadas por genes blancos comunes de AP-1 y NF-kappaB.

A partir de la Figura 61, resaltamos el efecto inhibitorio de FKBP51 sobre los niveles endógenos (A-B) y la actividad proteolítica de MMP-2 (C-D). Asimismo, observamos una reducción de los niveles de la proteína IL-6 en el medio condicionado del clon estable de FKBP51 (E).

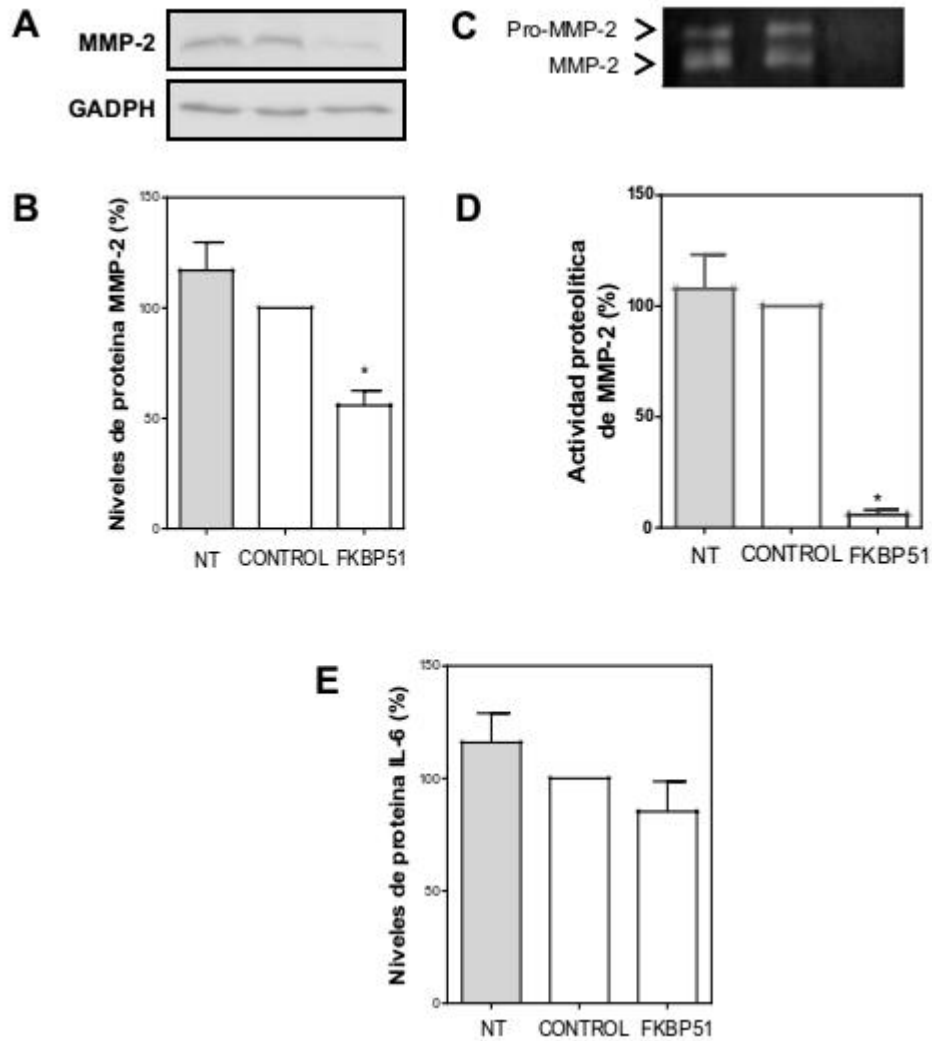


Figura 61. Efectos de la sobreexpresión estable de FKBP51 sobre parámetros biológicos de genes blancos de AP-1 y NF-kappaB

Células BeWo no transfectadas (NT, columna gris) y clones estables (Control y de FKBP51) se indujeron con PMA (100 ng/ml) durante 48 h. Transcurrido dicho lapso de tiempo, se evaluaron distintos parámetros. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes. Tras descontar el valor basal del grupo control (vehículo), se normalizaron los resultados al valor promedio del clon estable Control (se le asigna el valor arbitrario de 100%). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre una condición dada y el clon estable Control, determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$).

A. Análisis de los niveles de la proteína MMP-2.

B. Densitometría de los niveles de la proteína MMP-2. Los resultados se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína MMP-2 (promedio \pm desvío estándar), normalizados a los valores del clon estable Control.

C. Análisis de las áreas de gelatina degradadas del zimograma.

D. Densitometría de las áreas de gelatina degradadas. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad proteolítica de MMP-2 (promedio \pm desvío estándar), normalizados a los valores del clon estable Control

E. Los niveles de IL-6 en el medio condicionado se midieron mediante la técnica de ELISA. Los resultados se expresan como el porcentaje de los niveles de IL-6 (promedio \pm desvío estándar), normalizados a los valores del clon estable Control.

Por último, analizamos el efecto de FKBP51 sobre el número de células y colonias (Figura 62).

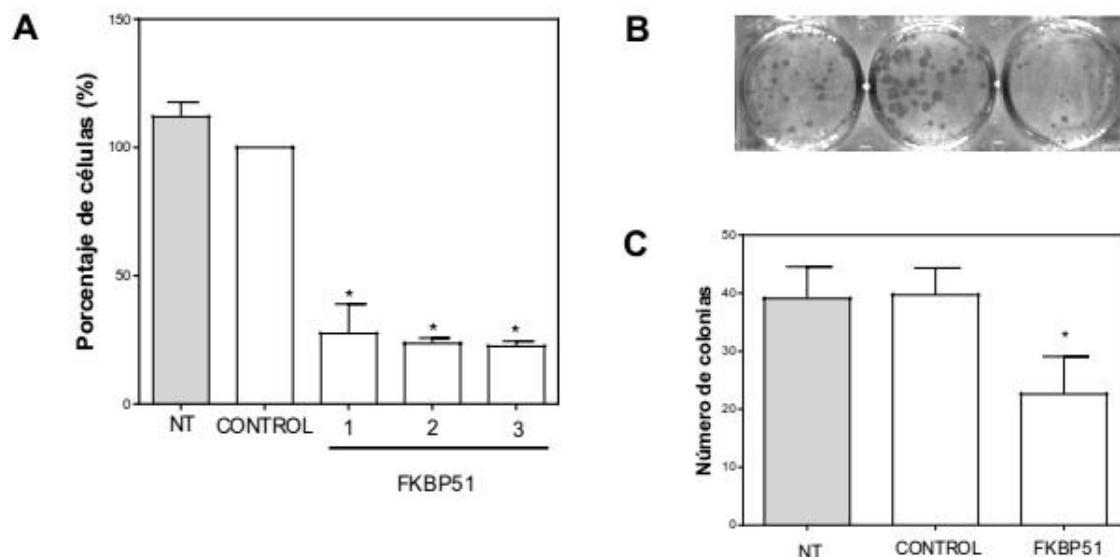


Figura 62. Efectos de la sobreexpresión estable de FKBP51 sobre el número de células y colonias

El estudio de los efectos de FKBP51 sobre el número de células y colonias se realizó con células BeWo no transfectadas (NT, columna gris) y clones estables (Control y de FKBP51). Tras una deprivación previa de SFB de 24 h, las células se mantuvieron en condiciones óptimas de cultivo durante A) 3 días y B-C) 10 días. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre una condición dada y el grupo control, determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$).

A. El número de células contabilizó por exclusión de captación de azul del tripán 0.4 % v/v. Los resultados se expresan como el porcentaje del número de células (promedio \pm desvío estándar), normalizados al valor promedio del clon estable Control (se le asigna arbitrariamente el valor del 100%).

B. Imágenes representativas del número y aspecto de las colonias de cada condición experimental.

C. El número de colonias se contabilizó por coloración con azul violeta 0.1 % v/v. Los resultados se expresan como el número de colonias (promedio \pm desvío estándar).

Por un lado, reproducimos el esquema experimental de la Figura 58 empleando en este caso puntual los clones estables de FKBP51. Dentro de este contexto, determinamos que la sobreexpresión estable de FKBP51 genera una marcada reducción del número de células del alrededor del 80 % (Figura 62 A).

Por otro lado, estudiamos el efecto de sobreexpresión de FKBP51 sobre el número de colonias a largo plazo (Figura 62 B-C). La capacidad del clon de FKBP51 para formar colonias a baja confluencia celular fue evaluada 10 días

post-siembra, observándose una reducción significativa del número (alrededor del 50%) y tamaño de las colonias con respecto al clon estable del vector vacío. Asimismo, registramos diferencias cualitativas en el tamaño de las colonias entre el clon estable Control y las células BeWo no transfectadas. Probablemente, dicha disparidad en el tamaño de las colonias responda al tratamiento selectivo continuo (con G418) que se aplica sobre las líneas estables.

Dado que cambios en el número de células y colonias son el resultado de un balance mutuo entre proliferación y muerte celular, estos hallazgos sugieren que FKBP51 podría estar influyendo en ese delicado equilibrio favoreciendo la muerte celular y /o inhibiendo la proliferación. Más aún, la modulación negativa de FKBP51 sobre AP-1 podría ser uno de los posibles mecanismos para explicar las variaciones observadas en el crecimiento del cultivo celular.

3. Efectos funcionales de EGCG sobre la acción regulatoria de FKBP52 descrita para los factores de transcripción AP-1 y NF-kappaB

3.1. Efectos de los flavonoides sobre la actividad transcripcional de AP-1 y NF-kappaB mediada por FKBP52

Los flavonoides son parte de una gran familia de polifenoles, ampliamente distribuidos en frutas y vegetales. Una de sus características principales es su capacidad antioxidante. En función de ella, los flavonoides son capaces de quelar iones de metales de transición (como Fe^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+}), de catalizar el transporte de electrones, de secuestrar o estabilizar EROs por hidrogenización o formación de complejos. Además de su capacidad antioxidante, los flavonoides modulan la actividad de un gran número de proteínas que intervienen en diferentes vías de señalización (Williams, 2004).

Estudios epidemiológicos han demostrado la estrecha relación entre el consumo de té verde y los efectos positivos de los flavonoides en la salud humana (Dwyer, 2013). Los extractos de té verde son rico en un tipo particular de flavonoides denominados flavan-3-oles. Dentro de los flavan-3-oles, encontramos a la catequina (C), la epicatequina (EC), la epicatequina-galato (ECG) y la epigallocatequina-galato (EGCG) (Figura 63). EGCG es el flavan-3-ol más abundante del té verde y responsable de la mayoría de los beneficios atribuibles a esta bebida (Wolfram, 2007). Investigaciones recientes sostienen que, si bien parte del mecanismo de acción de EGCG responde a sus propiedades antioxidantes, este flavonoide interacciona con numerosas proteínas modulando su actividad biológica. En ese sentido, EGCG interacciona con proteínas de la

membrana plasmática, activa mensajeros secundarios y vías de señalización, modula enzimas metabólicas, regula la expresión génica de varios factores de transcripción (como AP-1 y NF-kappaB) e interviene en procesos de autofagia (Dong, 1997; Yang, 2000; Aktas, 2004; Hwang, 2007; Valenti, 2013; Kumazoe, 2013; Kim, 2013).

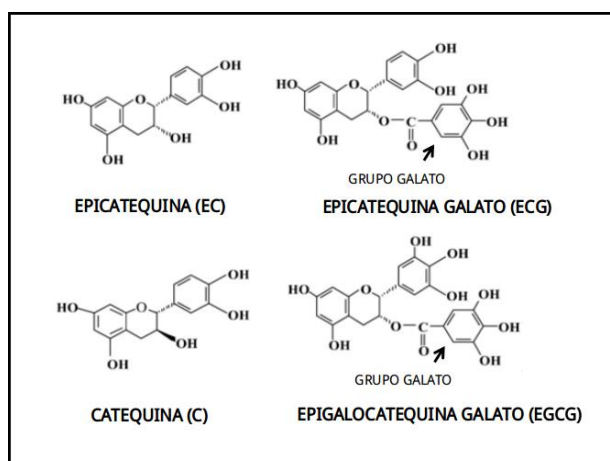


Figura 63. Estructuras de la familia de flavan-3-oles utilizadas en la Tesis Doctoral

Estructura de catequina (C), epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG) y epigallocatequina galato (EGCG) empleados en este trabajo. El grupo galato de ECG y EGCG se indican con una flecha.

En la búsqueda de ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción de EGCG, se ha descubierto que este flavonoide inhibe la actividad PPIasa de Pin1. En efecto, Urusova y colaboradores (2011) señalaron que la interacción de EGCG-Pin1 disminuye la abundancia de la ciclina D1 y la actividad transcripcional de ciertos factores nucleares (NF-kappaB y AP-1) vía PMA en células MEFs. Asimismo, se ha observado que EGCG bloquea la tumorigénesis mediada por Pin1 en estudios de xenograma murino. En concordancia a los antecedentes previos de EGCG, nos pareció interesante estudiar los efectos de este flavonoide sobre la acción regulatoria de FKBP52. Con este propósito, nos centramos en determinar cambios en la acción moduladora de FKBP52 sobre ciertos factores nucleares (AP-1 y NF-kappaB) bajo el estímulo de PMA.

En primer lugar, analizamos la actividad transcripcional de NF-kappaB ensayando distintas concentraciones de EGCG (5-50 μ M). En la Figura 64, se observa que EGCG inhibe la actividad transcripcional de NF-kappaB mediada por FKBP52 en células HEK-293T. Este efecto inhibitorio de EGCG sobre la acción regulatoria de FKBP52 resultó dependiente de la concentración, siendo su efecto efectivo a partir de concentraciones mayores o iguales a 25 μ M de EGCG.

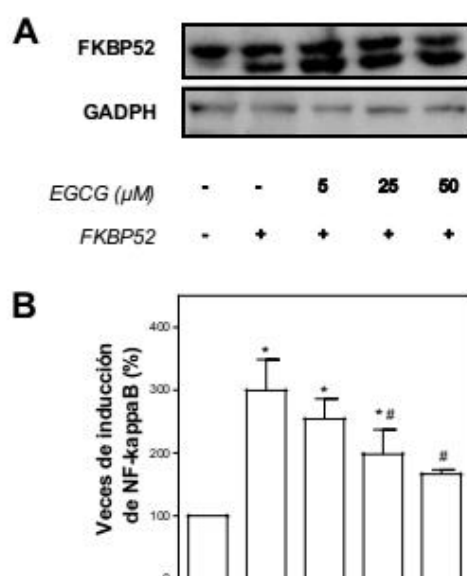


Figura 64. EGCG inhibe la actividad transcripcional de NF-kappaB mediada por FKBP52 de manera dependiente de la concentración en células HEK-293T

A. Análisis de los niveles de la proteína FKBP52 de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (1 μ g) o pCI-Neo-hFKBP52 (1 μ g). Luego de una preincubación con EGCG (5-50 μ M, 1 h), las células fueron tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 h.

B. La actividad transcripcional de NF-kappaB fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de NF-kappaB (promedio \pm desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β -galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %) mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52 sin pretratamiento con EGCG.

Más aún, observamos que el compuesto EGCG requiere de la sobreexpresión de la INM para que tenga lugar la regulación negativa sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB (Figura 65).

A continuación, se evaluó la capacidad regulatoria de otros miembros de la familia de flavan-3-oles (catequina [C], epicatequina [EC] y epicatequina galato [ECG]), a la cual EGCG pertenece, sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB en condiciones de sobreexpresión de FKBP52. Curiosamente, se detectó que los flavonoides con motivo galato (ECG y EGCG) fueron los únicos capaces de inhibir la actividad transcripcional de NF-kappaB modulada por FKBP52 (Figura 66). Acorde con este resultado, numerosos autores resaltan la potente actividad biológica que exhiben ambos compuestos (Matsuo, 1996; Kondo, 2002; Babich, 2007; Feng, 2010).

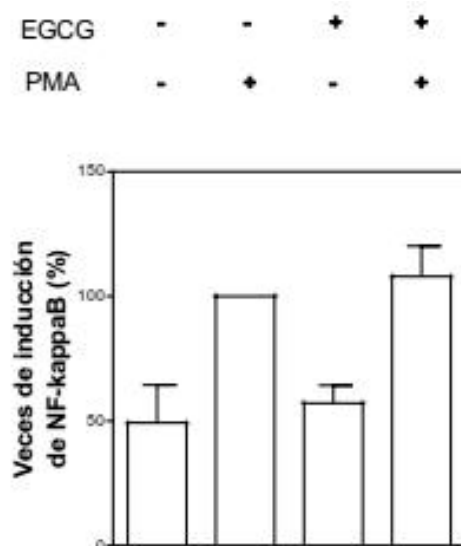


Figura 65. La sobreexpresión de FKBP52 es necesaria para el efecto inhibitorio de EGCG sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB

Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (1 µg) y luego de una preincubación con EGCG (25 µM, 1 h) en algunos casos, se trataron con PMA (100 ng/ml) durante 6 h. La actividad transcripcional de NF-kappaB fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de NF-kappaB (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa, y se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA sin preincubación con EGCG (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %).

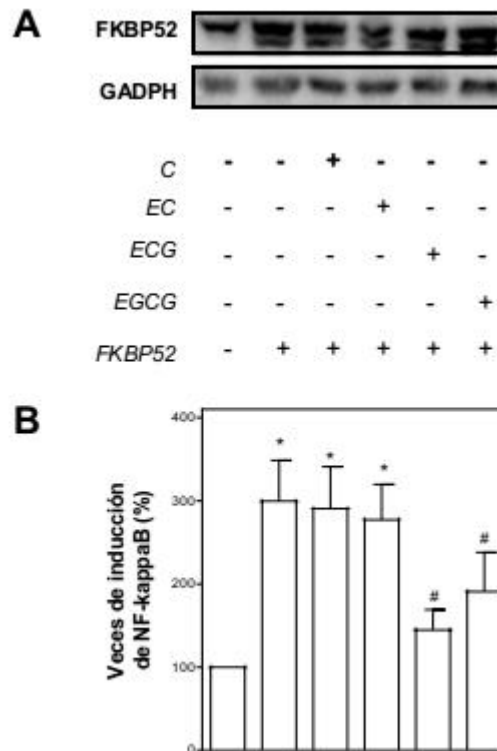


Figura 66. Los efectos de los flavonoides presentes en el té sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB en células HEK-293T

A. Análisis de los niveles de la proteína FKBP52 de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (1 µg) o pCI-Neo-hFKBP52 (1 µg). Luego de una preincubación con distintos flavonoides de té (C, EC, ECG, EGCG) a 25 µM durante 1 h, las células se trataron con PMA (100 ng/ml) por 6 h.

B. La actividad transcripcional de NF-kappaB fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de NF-kappaB (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52 sin pretratamiento con flavonoides.

Paso siguiente, se analizaron los efectos de EGCG sobre la actividad transcripcional de AP-1 en células HEK-293T. Tal como se muestra en la Figura 67, se determinó que la modulación de EGCG no se circunscribe únicamente a NF-kappaB sino por el contrario, es capaz de regular a FKBP52 en el contexto de otro factor de transcripción.

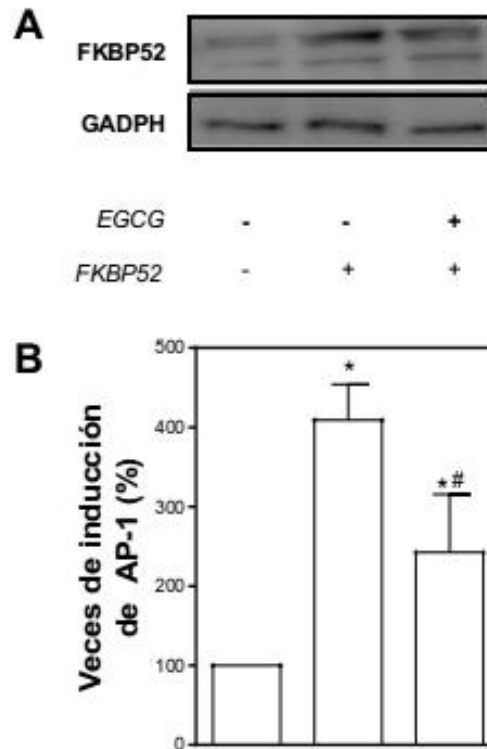


Figura 67. EGCG inhibe la actividad transcripcional de AP-1 mediada por FKBP52 en células HEK-293T

A. Análisis de los niveles de la proteína FKBP52 de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (1 μ g) o pCI-Neo-hFKBP52 (1 μ g). luego de una preincubación con EGCG (25 μ M, 1 h), las células se trataron con PMA (100 ng/ml) por 6 h.

B. La actividad transcripcional de AP-1 fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio \pm desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β -galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones experimentales determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52 sin pretratamiento con EGCG.

De forma análoga a lo descrito para NF-kappaB, la sobreexpresión de FKBP52 resultó un requisito necesario para que EGCG produzca cambios en la actividad transcripcional de AP-1 (Figura 68).

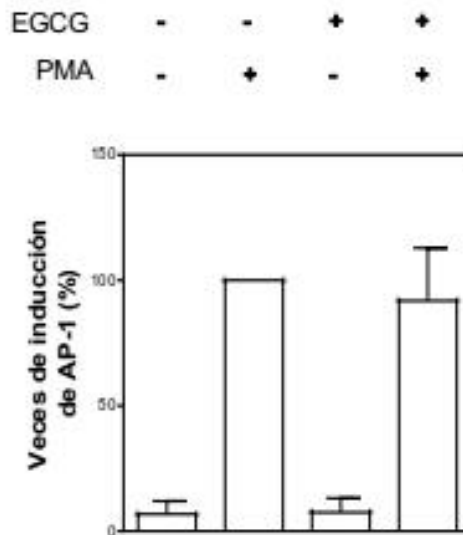


Figura 68. La sobreexpresión de FKBP52 es necesaria para el efecto inhibitorio de EGCG sobre la actividad transcripcional de AP-1

Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (1 µg) y luego de una preincubación con EGCG (25 µM, 1 h), en algunos casos, se trataron con PMA (100 ng/ml) durante 6 h. La actividad transcripcional de AP-1 fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa, y se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA sin preincubación con EGCG (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %).

Contextualizado el efecto de EGCG sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB y AP-1 en células HEK-293T, intentamos reproducir la misma batería de ensayos en las células BeWo.

En primera instancia, nos encontramos con la limitación de medir la actividad transcripcional de NF-kappaB dado una baja señal reportera. En consecuencia, redujimos el análisis de los efectos de EGCG al estudio de la actividad transcripcional de AP-1. En este marco, demostramos que EGCG inhibe el efecto estimulador de FKBP52 (Figura 69).

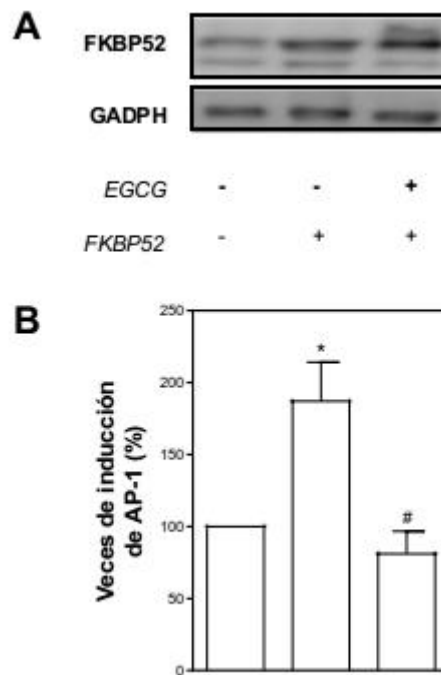


Figura 69. EGCG inhibe la actividad transcripcional de AP-1 mediada por FKBP52 en células BeWo

A. Análisis de los niveles de proteína de FKBP52 de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (1 µg) o pCI-Neo-hFKBP52 (1 µg) y luego de una preincubación con EGCG (25 µM, 1 h), las células se trataron con PMA (100 ng/ml) por 6 h.

B. La actividad transcripcional de AP-1 fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones experimentales determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$). Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP52 sin pretratamiento con EGCG.

La actividad represora de EGCG sobre la acción estimuladora de FKBP52 guarda similitud con los efectos funcionales de la droga FK506. Está reportado que FK506 inhibe la actividad transcripcional de NF-kappaB medida por FKBP52 en células HEK-293T (Erlejman, 2014). De manera semejante, FK506 no solo modula negativamente la acción estimuladora de FKBP52 sino también la actividad inhibitoria de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de AP-1 en células BeWo (Figura 70). Estas observaciones apoyan los resultados obtenidos en el apartado 1.6 del Capítulo 1. La actividad PPIasa de las FKBP5 cumple un

rol crítico sobre la regulación de la actividad transcripcional de AP-1 en células trofoblásticas BeWo.

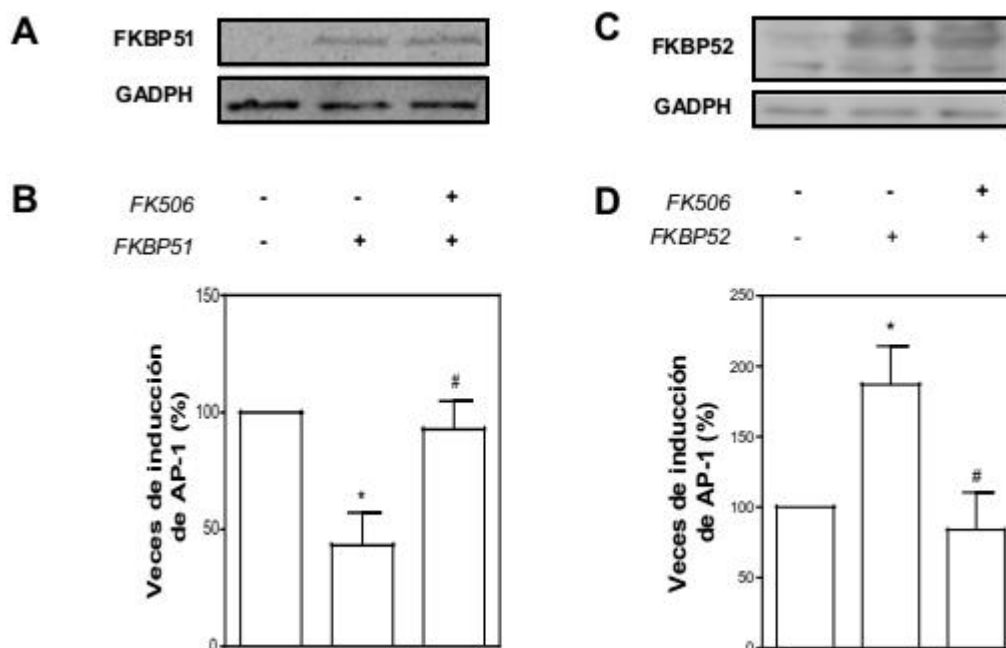


Figura 70. FK506 inhibe la actividad transcripcional de AP-1 mediada por FKBP5 en células BeWo

Análisis de los niveles de proteína FKBP51 (A) y FKBP52 (C) de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo (1 µg) o pCI-Neo-Flag-hFKBP51 o pCI-Neo-hFKBP52. Luego de una pre-incubación con FK506 (1 µM, 0.5 h), las células se trataron con PMA (100 ng/ml) durante 6 h.

La actividad transcripcional de AP-1 mediado por FKBP51 (B) o FKBP52 (D) fue evaluada mediante ensayos de gen reportero. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como veces de inducción de AP-1 (promedio ± desvío estándar), resultado del cociente entre la actividad de luciferasa / β-galactosidasa. Una vez descontado el valor basal del grupo control (vehículo), los valores se normalizan al valor promedio del grupo control inducido con PMA (cuyo valor arbitrario corresponde al 100 %). El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas entre condiciones determinadas por la prueba estadística de Anova (p<0.05). El asterisco (*) compara valores con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia al grupo FKBP51/FKBP52 sin pretratamiento con FK506, según corresponda.

3.2. Efectos de los flavonoides sobre la viabilidad celular

Consideramos también que el efecto observado pueda deberse a una posible citotoxicidad de los flavonoides del té verde ensayados, por lo tanto analizamos

la viabilidad celular por reducción del compuesto MTT. Para tal fin, las células se incubaron con los compuestos a distintas concentraciones y tiempos.

Por un lado, como se muestra en la Figura 71, observamos que los flavonoides del té verde no afectan la viabilidad de las células HEK-293T a baja concentración (25 μ M) y tiempos cortos de incubación (7 h) semejantes a los ensayados en los experimentos del apartado 3.1 de la sección Resultados.

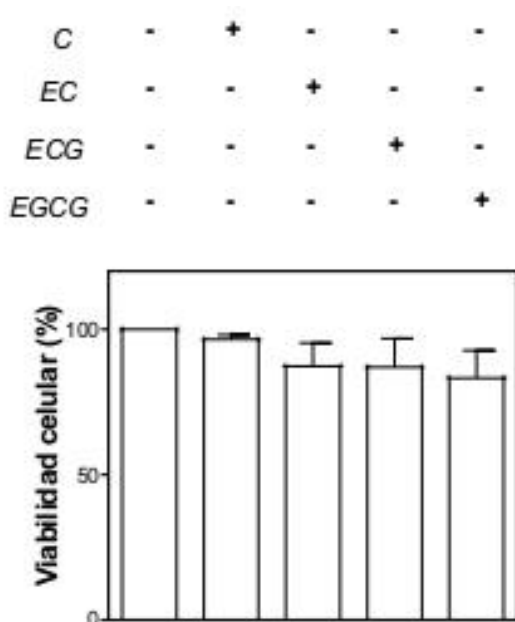


Figura 71. Efectos de los flavonoides presente en el té verde sobre la viabilidad celular de las células HEK-293T
 Células HEK-293T fueron incubadas con distintos tipos de flavonoides presentes en té verde (25 μ M) durante 7 h . La viabilidad celular fue evaluada mediante ensayos de MTT. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como porcentaje de viabilidad celular (promedio \pm desvio estándar), normalizado al grupo control (vehículo).

Cuando estudiamos el efecto de EGCG a concentraciones mayores (50 μ M), detectamos que causa una reducción del porcentaje de la viabilidad celular de aproximadamente 25 % (Figura 72).

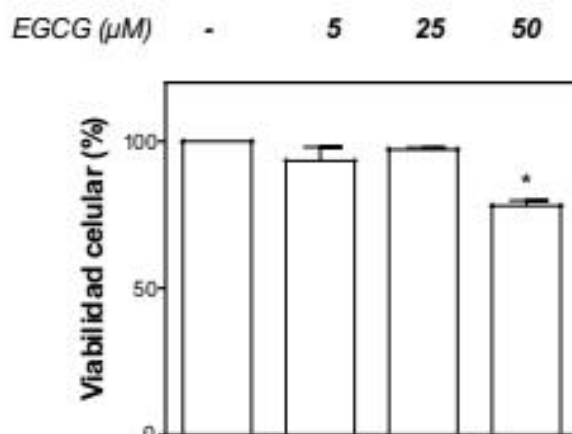


Figura 72. EGCG afecta la viabilidad celular de las células HEK-293T a altas concentraciones

Células HEK-293T fueron incubadas con EGCG (10-50 μM) durante 7 h. La viabilidad celular fue evaluada mediante ensayos de MTT. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como porcentaje de viabilidad celular (promedio \pm desvío estándar), normalizado al grupo de células tratadas con el vehículo. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo control, determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

Por otro lado, cuando las células BeWo se incubaron con EGCG a tiempos largos (24 o 48 h), encontramos variaciones significativas en el número de células BeWo, cuya magnitud varía en función de la concentración y tiempo final de incubación con EGCG (Figura 73 y Figura 74). Considerando estos resultados, se calculó el valor de concentración citotóxica 50 (CC50) para los tiempos de 24 h y 48 h, siendo $\text{CC50} = 56,6 \mu\text{M}$ y $\text{CC50} = 40,2 \mu\text{M}$, respectivamente.

En resumen, la viabilidad de ambas líneas celulares decrece conforme mayor es la concentración de EGCG y mayor es el tiempo de incubación. Cabe destacar que luego de incubar las distintas líneas celulares con EGCG 25 μM no observamos cambios significativos en la viabilidad celular, para los tiempos de incubación ensayados.

EGCG

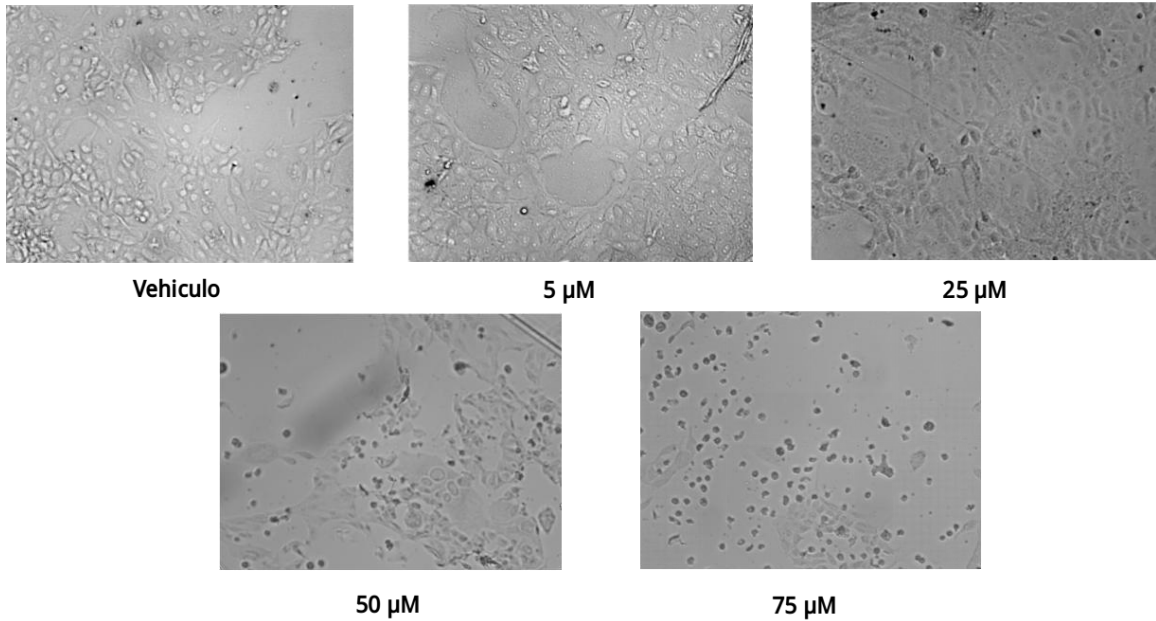


Figura 73. Efecto de EGCG sobre la morfología y número células BeWo.

Imágenes representativas de campo claro de células BeWo incubadas con distintas concentraciones de EGCG (5-75 μM) durante 24 h.

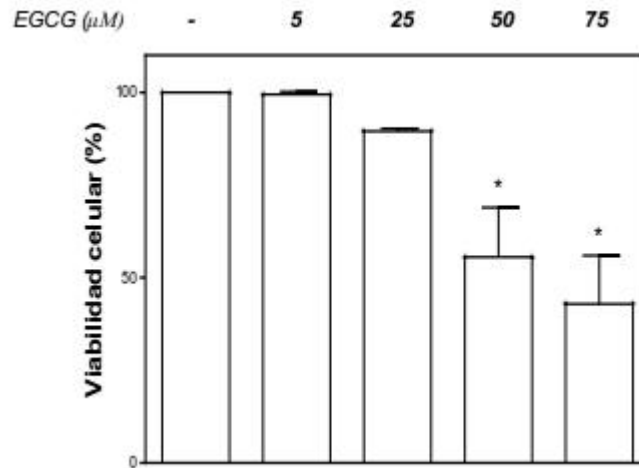


Figura 74. EGCG disminuye la viabilidad celular de las células BeWo de manera dependiente de la concentración

Células BeWo fueron incubadas con EGCG (5-75 μM) durante 24 h. La viabilidad celular fue evaluada mediante ensayos de MTT. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Éstos se expresan como porcentaje de viabilidad celular (promedio \pm desvío estándar), normalizado al grupo de células tratadas con el vehículo. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al grupo control, determinadas por la prueba estadística de Anova ($p < 0.05$).

3.3. Efectos de EGCG sobre las funciones biológicas de AP-1 y NF-kappaB

Considerando el efecto de EGCG sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB y AP-1 mediados por FKBP52, nos preguntamos si este efecto podría traducirse en cambios sobre las funciones biológicas de ambos factores nucleares, tales como la expresión de IL-6 y la actividad proteolítica de MMP-2 en células trofoblásticas BeWo.

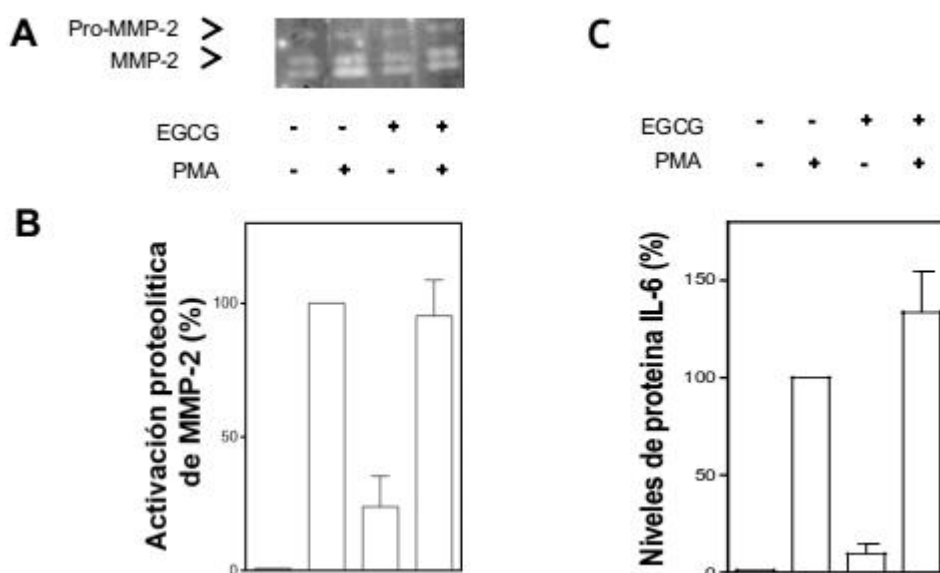


Figura 75. Efectos de EGCG sobre la actividad proteolítica de MMP2 y los niveles de IL-6

A. Análisis de las áreas degradadas de gelatina. Tras una preincubación con EGCG (25 μ M, 1 h), las células BeWo fueron inducidas con PMA (100 ng/ml) durante 24 h.

B. La actividad proteolítica de MMP-2 se midió mediante la técnica de zimografía.

C. Los niveles de IL-6 se midieron mediante la técnica de ELISA.

Los resultados B y C se expresan como el porcentaje de la actividad proteolítica de MMP-2 y los niveles de IL-6 (promedio \pm desvío estándar) respectivamente, normalizados a los valores del grupo control inducido con PMA (cuyo valor se fija arbitrariamente al 100 %). Estos resultados son representativos de 3 ensayos independientes.

Hasta el presente se ha documentado que EGCG interfiere en múltiples estadios de la regulación de IL-6 y particularmente, de MMP-2. En concreto, varios autores señalan que EGCG disminuye la expresión de MMP-2 e IL-6,

bloquea estéricamente a MMP-14 y aumenta los niveles de TIMP-2 en varias líneas celulares. De ahí que, nos interesó determinar si EGCG *per se* induce cambios sobre los niveles de IL-6 y la actividad proteolítica de MMP-2 (Figura 75). Dentro del marco experimental consensuado, no observamos cambios significativos de los parámetros evaluados en virtud de la incubación o no con el flavonoide EGCG.

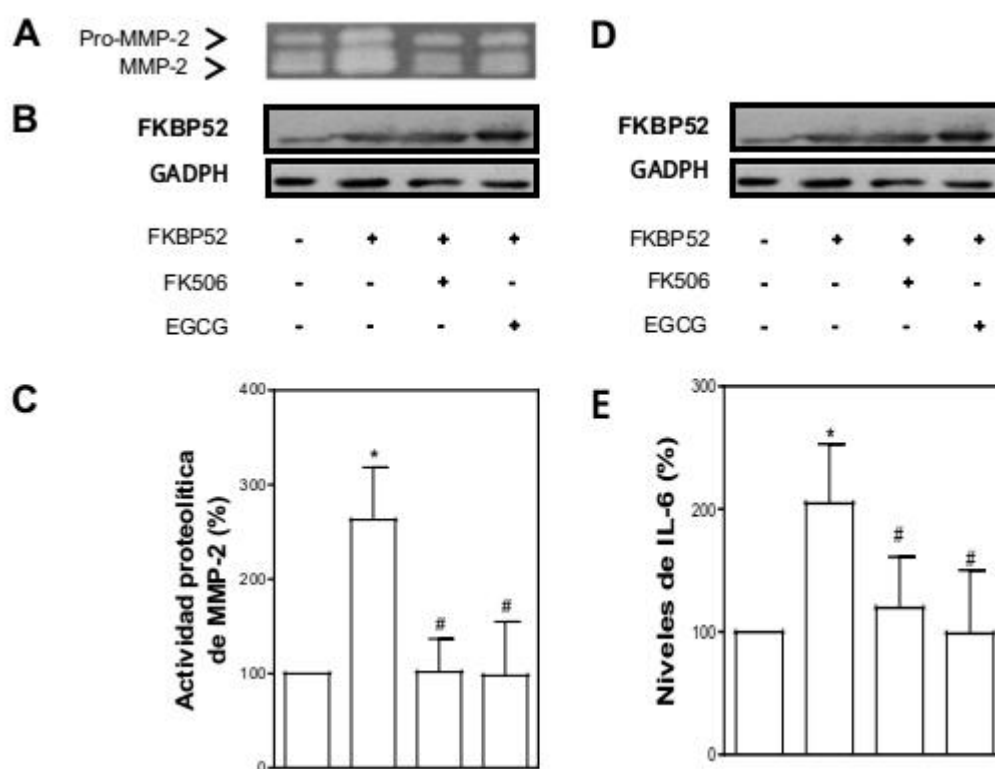


Figura 76. Efectos de EGCG sobre la actividad proteolítica de MMP2 y los niveles de IL-6 mediados por FKBP52

A. Análisis de las áreas degradadas de gelatina de células BeWo transfectadas con los plásmidos pCI-Neo o pCI-Neo-hFKBP52. Tras una preincubación con EGCG (25 μ M, 1 h) o FK506 (1 μ M, 0.5 h), las células fueron inducidas con PMA (100 ng/ml) durante 24 h.

B-D. Análisis de los niveles de proteína FKBP52.

C. La actividad proteolítica de MMP-2 se midió mediante la técnica de zimografía.

E. Los niveles de IL-6 se midieron mediante la técnica de ELISA.

Los resultados C y D se expresan como el porcentaje de la actividad proteolítica de MMP-2 y los niveles de IL-6 (promedio \pm desvío estándar) respectivamente, normalizados a los valores del grupo control inducido con PMA (cuyo valor se fija arbitrariamente al 100 %). Estos resultados son representativos de 3 ensayos independientes. El asterisco (*) y el numeral (#) indican diferencias significativas determinadas por la prueba estadística Anova ($p < 0.05$). El asterisco (*) compara una condición dada con el grupo control estimulado con PMA mientras que el numeral (#) toma de referencia a la condición de sobreexpresión de FKBP52 sin pretratamiento con EGCG o FK506.

Avanzando en nuestro razonamiento, repetimos los ensayos anteriores pero esta vez en condiciones de sobreexpresión de FKBP52. Mediante estos ensayos, demostramos que efectivamente EGCG, al igual que FK506, reprimen la modulación positiva de FKBP52 sobre la actividad proteolítica de MMP-2 y la cantidad de IL-6 en el medio condicionado (Figura 76).

3.4 Estudio de la unión in silico de FKBP52 y EGCG

Por último, para sumar evidencias de una posible interacción directa entre FKBP52 y EGCG, se recurrió a una herramienta computacional, como es el análisis bioinformático del acoplamiento molecular de FKBP52-ligando. Para esto las estructuras químicas de los ligandos EGCG y FK506 se dibujaron con el programa Marvin Sketch. El análisis de la unión *in silico* de FKBP52 y el compuesto EGCG se realizó mediante el uso de dos estructuras tridimensionales del dominio FK1 y FK2 de FKBP52 libre (PDB: 1Q1C) o unida a FK506 (PDB:4LAX). La determinación de las coordenadas de la grilla de unión del complejo se ubicaron espacialmente en función de los aminoácidos reportados como claves para la configuración estructural y funcional del dominio PPIasa empleando la aplicación Autodock Mgltools. Las energías de unión de los complejos FKBP52-ligando fueron calculados y ordenados de menor a mayor por la aplicación AutodockVina.

Como bien se describió en la Introducción, FKBP51 y FKBP52 contienen dos dominios N-terminales (FK1 y FK2) que guardan similitud estructural con FKBP12. El dominio FK1 de ambas proteínas contienen el bolsillo catalítico activo, responsable de la actividad PPIasa de las FKBP, y el sitio de unión de FK506. Mientras que el dominio FK2, estructuralmente similar a FK1, carece de actividad PPIasa y no se une a FK506. Además del bolsillo catalítico de FK1, existe un bucle rico en prolinas situado por arriba del sitio activo que actúa como superficie de interacción crítica en la regulación de receptores nucleares (Sinars, 2013).

Recientemente, se ha observado que la configuración espacial de pequeños bucles que circundan al bolsillo catalítico cumplirían un rol importante sobre la actividad enzimática de FKBP52 (Hung, 2014).

En la tabla 4 se muestran los valores de afinidad de unión de los acoplamientos moleculares del complejo proteína-ligando.

Tabla 4: Energía de unión de los complejos FKBP52- ligando (EGCG o FK506)

	Energía de unión (Kcal/mol)	
	1Q1C	4LAX
EGCG	-6.7	-6.8
FK506	-6	-9.4

En función de la Tabla 4, observamos que EGCG presenta un valor de energía de unión a FKBP52 similar al inhibidor específico de las FKBP5 para la conformación del dominio FK1-FK2 de FKBP52 libre de ligando. No obstante cuando se analiza el acoplamiento molecular de la estructura de FKBP52 cristalizada con FK506, se observa que la energía de unión para EGCG es menor en relación a FK506. Probablemente esta diferencia de energía de unión entre ambos compuestos responda a restricciones estéricas condicionadas por la unión de FK506 a FKBP52.

Se evaluó la fiabilidad del método tomando de referencia al compuesto FK506 dispuesto en la conformación de FKBP52 cristalizada con el inhibidor, y se observó que los resultados de acoplamiento molecular se aproximaban, con pequeñas incertezas, a los datos experimentales.

Como conclusión del apartado, se determinó que EGCG es capaz de interactuar virtualmente con el bolsillo catalítico de FKBP52 (libre de FK506), con energía de enlace similar a FK506 (Figura 77). Esta observación apoya la hipótesis de que EGCG podría actuar como un inhibidor natural de la actividad enzimática de FKBP52 e influir sobre la actividad biológica de AP-1 y NF-kappaB.

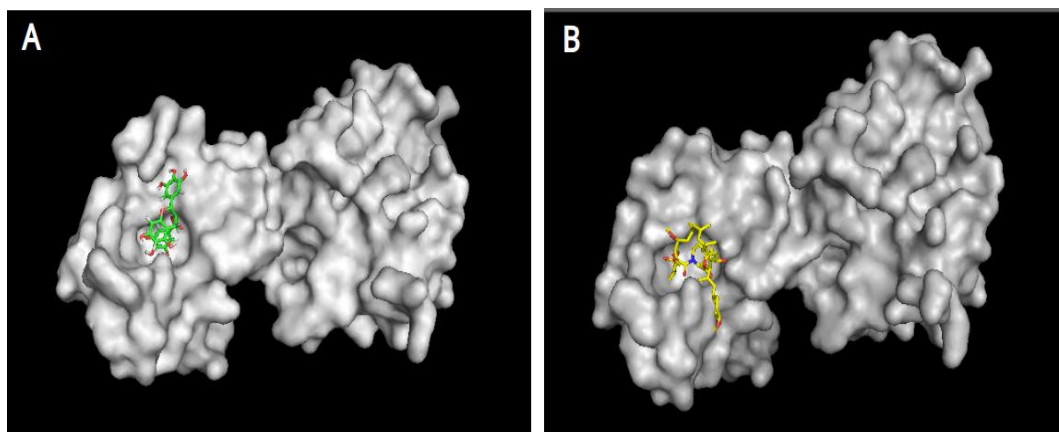


Figura 77. Unión *in silico* de EGCG y FK506 al bolsillo catalítico de FKBP52

Imágenes representativas del acoplamiento *in silico* de EGCG (A) y FK506 (B) al bolsillo catalítico de FK1, generadas por el programa UCSF Chimera. Los dominios FK1 y FK2 de FKBP52 están coloreados en gris, el flavonoide EGCG en verde y FK506 en amarillo.

DISCUSIÓN

1. Discusión del capítulo 1

La regulación de las vías de señalización constituye un factor clave en el desarrollo de diferentes procesos básicos y especializados que suceden en las células. En este sentido, el estudio experimental acumulativo en esta área ha posibilitado identificar el importante rol que desempeñan las INMs de alto peso molecular en muchos de estos procesos (Horowitz, 2002; Steger, 2002; Galigniana, 2010; Liou, 2011; Erlejman, 2014). Estas INMs poseen dominios TPR a través de los cuales se asocian a otras proteínas y un dominio PPIasa que tiene actividad peptidil-prolil cis/trans-isomerasa. La actividad enzimática del dominio PPIasa se inhibe por unión al macrólido FK506.

La primera caracterización sobre la participación de las INMs en vías de señalización fue descrita para los RE. Los RE forman complejos multiproteicos con un grupo de chaperonas moleculares, entre las que se destacan Hsp90 e INMs de alto peso molecular. Tradicionalmente, se consideró que las funciones de las chaperonas asociadas al complejo se limitaban únicamente a la receptividad y retención del receptor en el citoplasma. Una vez ocurrida la transformación (disociación del heterocomplejo), se sugería que el receptor translocaba al núcleo donde posteriormente, dimerizaba y actuaba como FT (Dahmer, 1984). Sin embargo, años más tarde, miembros de nuestro grupo de trabajo propusieron un modelo alternativo. Este modelo sostiene que distintas proteínas del heterocomplejo no solo juegan un rol crítico en la receptividad del ligando sino también en el transporte activo del complejo y actividad transcripcional del receptor. En particular, dos INMs denominadas FKBP51 y FKBP52 intervienen en cada de una de estas instancias desempeñando funciones antagónicas entre sí (Galigniana, 2001; Galigniana 2010). Actualmente, se ha extendido el estudio de las funciones regulatorias de FKBP51 y FKBP52 a

otros factores nucleares, tales como NF-kappaB y p53 (Galigniana, 2004; Erlejman 2014). En este contexto, nuestro grupo de trabajo ha hecho un aporte importante sobre la regulación de NF-kappaB mediado por las proteínas FKBP51/FKBP52. Demostramos que existe una interacción entre estas INMs y NF-kappaB, y que las FKBP5 regulan en forma contrapuesta la activación de este factor nuclear. Por un lado, determinamos que FKBP51 retrasa la translocación nuclear de RelA/p65 e inhibe la actividad transcripcional de NF-kappaB. Por otro lado, FKBP52 prolonga la retención nuclear de RelA/p65 y estimula la actividad transcripcional de dicho FT. En contraste con RE, los efectos de las FKBP5 sobre NF-kappaB son independientes de Hsp90 (Erlejman, 2014). No obstante, otros autores señalan que la chaperona Hsp90 intervendría en eventos tempranos de la activación de NF-kappaB formando complejos con FKBP51 e IKK (Romano, 2015). La importancia funcional de la actividad PPIasa de las FKBP5 constituye otro rasgo a destacar. También, a diferencia de la activación de RE vía FKBP5, la actividad PPIasa de FKBP52 resulta ser condición indispensable para la modulación positiva que ejerce sobre NF-kappaB. Por el contrario, FKBP51 no requiere de dicha actividad enzimática para su acción inhibitoria (Erlejman, 2014). En suma, estos hallazgos sugieren que la regulación de las FKBP5 sobre el retrotransporte y actividad transcripcional podría ser un proceso que también afecta a factores nucleares de variada naturaleza pero que comparten la propiedad de estar sujetos a la relocalización subcelular en respuesta a un estímulo dado.

Los FTs de la familia AP-1 son proteínas ubicuas, con dominio bZip, correspondientes a las subfamilias de Fos, Jun, MAF o ATF (Glover, 1995; Shaulian, 2002; Eferl, 2003). Regulan una multitud de genes involucrados en diversos procesos celulares en respuesta a una amplia variedad de estímulos, tales como factores de crecimiento, ésteres de forbol, citoquinas, neurotransmisores y radiación UV (Angel, 1991). Para desempeñar sus funciones, los FTs AP-1 son regulados finamente en distintas instancias de la vía de

señalización. Las modificaciones postraduccionales, en particular la fosforilación, constituyen mecanismos de regulación críticos para este FT. En efecto, la fosforilación de AP-1 desencadena una activación rápida e independiente de la síntesis de novo (Herdegen, 1998; Sng, 2000).

Existen numerosas quinasas capaces de fosforilar a AP-1, entre las cuales se destacan miembros de la familia de las MAPK como ERK y JNK. Ambas quinasas intervienen en la fosforilación de c-Fos y c-Jun, respectivamente (Pulverer, 1991; Smeal, 1991; Okazaki y Sagata, 1995; Murphy, 2002; Monje, 2003; Sasaki, 2006; Gomard, 2008). Tanto ERK (ERK 1 y ERK 2) como JNK (JNK 1 y JNK 2) cuentan con isoformas estructuralmente similares y efectores comunes. A pesar de la gran cantidad de trabajos sobre el tema, todavía resulta controversial si las isoformas de ERK o bien de JNK, son funcionalmente diferentes o redundantes entre sí (Sabapathy, 2004; Yao, 2014; Buscà, 2016).

Ante estos antecedentes, el objetivo del Capítulo 1 ha sido profundizar el conocimiento de los mecanismos de regulación de las FKBP sobre los FTs de la familia de AP-1, en particular sobre c-Fos. En tal sentido, nos centramos en la caracterización de los mecanismos regulatorios de las FKBP sobre AP-1 en un modelo de células trofoblásticas humanas (BeWo). Utilizamos al éster de forbol PMA como estímulo central. Dado que a nivel práctico, las células BeWo se transfectan con una eficiencia moderada (20-30%), se utilizó adicionalmente la línea celular HEK-293T para los ensayos de genes reporteros. Esta línea celular ofreció mayor versatilidad en la transfección de plásmidos y sensibilidad de respuesta.

Lo primero que analizamos en el presente capítulo fueron los efectos de las FKBP sobre los eventos tempranos de activación de AP-1. En particular, nos centramos en la fosforilación de las quinasas de las MAPKs.

Hasta la actualidad, existe un único registro de la acción de las INMs sobre los miembros de la cascada de las MAPK (Park, 2012). Se observó que Pin1 isomeriza a la quinasa JNK actuando sobre motivos pThr-Pro específicos y

genera un cambio conformacional que favorece la unión con sus sustratos específicos. Por su parte, los resultados que se expusieron en este capítulo demuestran que la sobreexpresión de FKBP52 favorece un incremento sostenido de los niveles de ERK (su forma activa) en respuesta al tratamiento con PMA (Figura 13). En forma semejante, al sobreexpresar FKBP52 observamos un aumento de los niveles de p-JNK, con la única salvedad que no fue posible normalizarlos respecto a JNK total tal como lo efectuamos para la quinasa ERK. De este modo, los niveles de p-JNK se normalizaron a los valores de GAPDH (control de carga) (Figura 16), detectando un efecto de FKBP52 representado como un aumento de p-JNK, también durante un periodo de tiempo mayor.

En este aspecto, resultaría interesante determinar si FKBP52 genera cambios en estado de fosforilación de JNK o bien, modifica la expresión de dicha quinasa.

Habiendo determinado cambios en la fosforilación de ERK dada la sobreexpresión de FKBP52, nos preguntamos que efectos tendría la activación sostenida de ERK mediada por FKBP52 sobre la vía de señalización de c-Fos. La cinética de activación de la vía de ERK constituye uno de los mecanismos temporo-espaciales que condicionan la respuesta biológica. En efecto, cambios en la magnitud como la duración de la actividad de ERK pueden derivar en distintos comportamientos celulares (Greenberg, 1985; Vouret-Craviari, 1993; Weber, 1997).

Las proteínas codificadas por IEGs, tales como c-Fos, son buenos candidatos para monitorear la duración de la activación de una cascada intracelular. En este sentido, ausencia de estímulo, estas proteínas se encuentran a niveles bajos o indetectables; pero una vez que las células son estimuladas, los IEGs son transcripcionalmente inducidos en unos pocos minutos y los niveles de proteína incrementan rápidamente. Sin embargo, la inducción de IEGs es insuficiente para que sus productos funcionen como factores de transcripción. Se requieren de instancias de activación y estabilización posteriores para que esto ocurra

(Herschman, 1991; Morgan, 1991). El enfoque experimental sobre c-Fos como sensor de la duración de la activación de ERK propuesto por Murphy y colaboradores (2002), implicó un aporte valioso a esta área de estudio. Lo novedoso de esta investigación resultó ser el descubrimiento de niveles de regulación adicionales dependiente de la quinasa ERK. El modelo sugerido propone tres pasos: en primer lugar, una vez que ERK es fosforilado, la transcripción de c-fos es inducida rápidamente. Esto sucede por la acción de ERK sobre los factores de transcripción que se unen al promotor de c-fos, que incluyen a Elk-1 y otros miembros del complejo ternario. En segundo lugar, dada la naturaleza inestable de la proteína c-Fos, ERK es capaz de fosforilar a c-Fos y estabilizarla. Este paso requiere la presencia de ERK y/o RSK en el núcleo en el momento que c-Fos se ha acumulado. En tercer lugar, ERK se une a c-Fos en un sitio específico denominado DEF lo cual permite fosforilaciones posteriores en el extremo C-terminal que resultan en cambios en la localización nuclear, tasa de unión a secuencias de ADN dianas y actividad transcripcional. Estos tres niveles de regulación mediados por ERK ocurren secuencialmente y tienen lugar únicamente cuando la activación de ERK es sostenida en el tiempo. En otros términos, cuando ERK es activado en forma transitoria, c-Fos no se fosforila y rápidamente se degrada. Por el contrario, la activación sostenida de ERK resulta en una fosforilación eficiente de c-Fos en su extremo C-terminal, lo cual lo estabiliza por varias horas y favorece su acción como factor de transcripción (Stork, 2002).

En consonancia con el modelo de Murphy, observamos que la activación sostenida de ERK, inducida por PMA e incrementada por FKBP52, correlacionaba con un aumento de los niveles de proteína (Figura 18 y Figura 19) y de la estabilidad de c-Fos (Figura 24). De igual modo, se detectó un aumento de la retención nuclear de c-Fos (Figura 30), de su unión al ADN (Figura 47 y Figura 48) y de la actividad transcripcional de AP-1 (Figura 38).

En contraste, FKBP51 no alteró la cinética de activación de ERK (Figura 15). Más aún, no se observaron cambios en la estabilidad (Figura 24) ni en los niveles de proteína de c-Fos (Figura 19). Dentro de la variedad de parámetros evaluados de la vía de c-Fos, la sobreexpresión de FKBP51 únicamente alteró la localización subcelular (Figura 30) y actividad de transcripcional de c-Fos (Figura 41). En efecto, FKBP51 retrasó la importación nuclear y disminuyó la fracción máxima acumulada de c-Fos en el núcleo. Asimismo, FKBP51 inhibió la actividad transcripcional de AP-1.

Cabe señalar que la regulación de las FKBP5 sobre la localización subcelular de c-Fos y la actividad transcripcional de AP-1 guarda similitud con el comportamiento ya descrito de ambas FKBP5 sobre ciertos factores nucleares (RE y NF-kappaB). Atendiendo a estas evidencias, ha de resaltarse el papel clave que desarrollan las FKBP5 modulando el transporte y la función de FTs, siendo ésta última dependiente de la relación de expresión de ambas INMs. No obstante, existen diferencias al comparar las interacciones entre las FKBP5 y los factores nucleares. En ausencia de estímulo, GR y NF-kappaB interactúan exclusivamente con FKBP51. Tras el estímulo específico, ambos factores nucleares intercambian FKBP51 por FKBP52 y en virtud de ello, son retrotransportados al núcleo. Por su parte, c-Fos interactúa con FKBP51 y FKBP52 en condiciones basales, siendo esta última INM la cual continúa asociada a c-Fos posterior al estímulo (Figura 45). Este resultado nos permite especular acerca de una posible competencia de ambas FKBP5 por c-Fos en condiciones basales cuyos efectos en principio desconocemos. Una vez acontecido el estímulo, el transporte activo de c-Fos al núcleo podría favorecerse. La interacción de c-Fos con la chaperona molecular Hsp90 plantea la posibilidad que c-Fos forme un heterocomplejo con Hsp90 y FKBP52. Ya en el núcleo, podemos suponer que FKBP52 genera cambios conformacionales de c-Fos. Estas modificaciones estimularían la actividad transcripcional y/o la interacción de c-Fos con otras proteínas. Un mecanismo de acción similar fue propuesto

para la parvulina Pin1. Según Monje y colaboradores (2003), luego de que ERK fosforila a c-Fos, Pin1 interacciona con el factor de transcripción e incrementa su actividad transcripcional.

Otro rasgo a destacar es la contribución funcional del dominio PPIasa de ambas FKBP. Determinamos que la regulación mediada por las FKBP es dependiente de su actividad PPIasa, pues la acción de las FKBP sobre AP-1 no sólo es abolida por la droga FK506 (que inhibe la actividad de PPIasa) sino también por el uso de mutantes puntuales de las FKBP del sitio catalítico PPIasa. A diferencia de GR y NF-kappaB, la actividad PPIasa de FKBP51 pareciera tener un papel clave en la actividad inhibitoria de esta INM sobre AP-1. Esto se evidencia con los efectos de las mutantes puntuales del dominio PPIasa de FKBP51 en células HEK-293T y BeWo, además del efecto del pretratamiento con FK506 analizado en esta última línea celular. Particularmente, la sobreexpresión de FKBP51 FD67/68DV en células HEK-293T no solo produce la pérdida del efecto inhibitorio de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de AP-1 sino que genera, además, un efecto estimulador (Figura 42). Como respuesta al efecto general e inhibitorio de FK506 sobre la actividad PPIasa de las FKBP, cabría determinar cual es el efecto de la droga SAFit sobre la actividad transcripcional de AP-1 mediada por FKBP51. El compuesto SAFit es un inhibidor específico de la actividad PPIasa de FKBP51 y resultaría útil testarlo con el fin de evaluar la potencial ganancia de función de la mutante FKBP51 FD67/68DV (Gaali, 2015).

Hay que mencionar también que, además del rol crucial del dominio PPIasa, el dominio TPR de FKBP52 cumple un importante rol en la modulación de la actividad transcripcional de AP-1 (Figura 40). La sobreexpresión de la mutante puntual FKBP52 K354A inhibe enteramente el efecto estimulador de FKBP52 salvaje sobre la actividad transcripcional de AP-1. Esto sugiere que el dominio TPR de FKBP52 está involucrado en un mecanismo de acción de la INM,

probablemente en la interacción con otras proteínas regulatorias como cofactores o Hsp (Hsp70, por ejemplo).

En virtud de que se utilizaron dos líneas celulares diferentes en la caracterización de la actividad transcripcional de AP-1, fue posible demostrar que la regulación de las FKBP51 y FKBP52 sobre AP-1 no es exclusiva de una línea celular específica. Más aún, el efecto regulatorio positivo de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de AP-1 no solo ocurre ante un único estímulo, dado que también se presenta cuando la activación de AP-1 se da mediante estímulos de distintas naturaleza como ser: éster de forbol (PMA), estrés oxidativo (TBOOH) e interlequina (IL-1 β) (Figura 44).

2. Discusión del capítulo 2

Numerosas investigaciones señalan que alteraciones en la expresión de la co-chaperona FKBP52 desencadenan insensibilidad a la hormona progesterona y problemas ginecológicos asociados, tales como fallas en la receptividad e implantación uterina, endometriosis y abortos recurrentes (Cox, 2004; Tranguch, 2005; Hirota, 2008; Chen, 2015). A estos trastornos utero-placentarios, se les suma la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino (Acar, 2015).

Hasta el presente, debido a su alta incidencia clínica, la patogénesis de la preeclampsia resulta un tema recurrente de estudio. Si bien la etiología de la preeclampsia aún no se conoce con exactitud, se cree que la hipoperfusión uteroplacentaria constituye uno de los mecanismos fisiopatológicos centrales (Zhou, 1997; Zhou, 2002). Dentro de este contexto, se subraya las deficiencias funcionales de MMPs. Las MMPs y las citoquinas desempeñan un importante rol en la remodelación de la MEC y vascularización de la interfase materno-placentaria (Kameda, 1990; Shimonovitz, 1994; Bischof, 2010; Suman,

2012). Entre la variedad de MMPs, las MMP-2 y MMP-9 determinan el comportamiento invasivo del citotrofoblasto extraveloso. La actividad proteolítica de ambas MMPs está sujeta a una estricta regulación que ocurre principalmente en tres instancias modulables por miembros de la familia de AP-1 y de NF-kappaB: transcripción, activación de la proenzima e inactivación por TIMPs (Bergman, 2003; Song, 2006; Clark, 2008; Vicent, 2015; Li, 2016)

Con respecto a las citoquinas, la IL-6 interviene en la vascularización de vellosidades coriónicas y en la remodelación de tejidos placentarios, modulando la expresión de metaloproteasas (Kameda,1990; Bischof, 2010). A nivel transcripcional, la expresión de la IL-6 está regulada por distintos factores de transcripción, entre los cuales se incluye a AP-1 y NF-kappaB (Beetz, 2000; Hungness, 2010; Spooren, 2010).

De evidencias anteriores, se desprende el protagonismo funcional de AP-1/NF-kappaB modulando elementos críticos de la implantación y desarrollo placentario. Atendiendo a los antecedentes expuestos, nos propusimos determinar los efectos biológicos de la regulación de las FKBP5 sobre genes blancos comunes de AP-1 y NF-kappaB. Con esa finalidad, abordamos una serie de ensayos funcionales empleando células BeWo y además, contamos con clones de expresión estable de FKBP51.

Al igual que los ensayos del Capítulo 1, se utilizó como estímulo central al éster de forbol PMA. Las células BeWo se indujeron con PMA a dos tiempos de incubación diferentes (24 h y 48 h). La elección de dos tiempos responde a los siguientes motivos: por un lado por la nitidez de las bandas de digestión de gelatina obtenidas mediante el ensayo de zimografía, y por otro lado, los niveles de IL-6 detectados por la técnica ELISA. En base a dichas consideraciones experimentales, las mediciones para FKBP52 se efectuaron a 24 h mientras que para FKBP51, se realizaron a las 48 h para asegurar una señal plausible de ser medida.

En primer lugar, nos enfocamos en estudiar la modulación de las FKBP5s sobre las MMP-2 y MMP-9. Para ello, recurrimos al análisis de niveles de proteínas endógenas mediante el ensayo de WB y a la determinación de la actividad proteolítica de las gelatinasas empleando la técnica de zimografía. Según bibliografía, sabemos que el éster de forbol PMA induce la expresión de MMP-9 en varios tipos celulares (Roomi, 2009) y que el gen de MMP-2 estaría regulado por AP-1. Por ensayos de WB, detectamos que el estímulo PMA incrementa los niveles de MMP-2 y MMP-9 a los tiempos ensayados (Figura 50). En lo que respecta a los efectos de FKBP52, observamos un claro aumento de los niveles de proteínas de ambas MMPs (Figura 51) e incremento de la actividad proteolítica de MMP-2 (Figura 53). Cabe mencionar que la modulación de FKBP52 sobre las MMPs resultó dependiente de la actividad enzimática de su dominio PPIasa. En condiciones de sobreexpresión de FKBP51, registramos una disminución de los niveles de proteína (Figura 52) y actividad proteolítica de MMP-2 (Figura 54). A diferencia de FKBP52, la actividad PPIasa de FKBP51 no contribuye funcionalmente al efecto inhibitorio de la INM sobre los niveles de proteína y actividad proteolítica de MMP-2. Más aún, no se detectaron cambios significativos de los niveles de proteína de MMP-9 en relación al grupo control (Figura 52). Cabe resaltar que no fue posible medir la actividad proteolítica de MMP-9 pero hubiera sido interesante evaluar su actividad.

En segundo lugar, analizamos la modulación de las FKBP5s sobre los niveles de proteína IL-6 en el medio condicionado de células trofoblásticas BeWo. Según el estudio Fujisawa (2000), el éster de forbol TPA induce la expresión de IL-6 en células trofoblásticas humanas BeWo. Dada la naturaleza química común entre ésteres de forbol, suponíamos que el PMA tendría consecuencias similares al TPA. En efecto, al inducir las células BeWo con PMA, se obtuvo un incremento significativo de los niveles de IL-6 para los dos tiempos ensayados (Figura 55). Paso seguido, evaluamos los efectos de las FKBP5s. En condiciones de sobreexpresión de FKBP52, observamos que FKBP52 favorece un aumento de

los niveles de IL-6 (Figura 56) y su acción regulatoria depende de la actividad enzimática de su dominio PPIasa. En cambio, en condiciones de sobreexpresión de FKBP51, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de IL-6 con el grupo control inducido con PMA (Figura 57). Curiosamente, la sobreexpresión de la mutante puntual del dominio PPIasa de FKBP51 o la preincubación con FK506 provocaron la reducción de los niveles de IL-6. Esta observación sugiere que la actividad PPIasa de FKBP51 interviene en la modulación positiva de los niveles de IL-6.

Mediante la caracterización de uno de los clones de expresión estable de FKBP51, obtuvimos resultados similares a los ensayos de transfección transitoria para dicha INM. En otras palabras, observamos una disminución de los niveles endógenos de proteína y actividad proteolítica de MMP-2 (Figura 61). Asimismo, detectamos una reducción de los niveles de IL-6 en el medio condicionado (Figura 61). A nivel de la actividad transcripcional de AP-1, hubo una reducción del 50 % de las veces de inducción de AP-1 (Figura 60).

Hay que mencionar que además del rol de AP-1 sobre diferentes genes involucrados en la motilidad e invasión celular, esta familia de FTs intervienen en eventos tales como la proliferación y la apoptosis. La proliferación y la apoptosis son dos mecanismos estrechamente vinculados que influyen sobre el crecimiento y desarrollo celular. A la luz del conocimiento actual, se sabe que c-Fos favorece la proliferación de células trofoblásticas BeWo aunque se desconoce que papel cumple a nivel de la apoptosis de dicha línea celular. Con el objeto de evaluar posibles cambios del crecimiento celular en condiciones de sobreexpresión de FKBP51, nos pareció interesante analizar el número de células y colonias a distintos plazos temporales. Por un lado, determinamos que la sobreexpresión de FKBP51, tanto transitoria como estable, genera una marcada reducción del número de células (de aproximadamente, 25 u 80 %, respectivamente) (Figura 58 y Figura 62). Por otro lado, observamos que los clones de FKBP51 se presentaron en un número significativamente más reducido que el grupo control

(alrededor del 50%), que también el tamaño de las colonias fue menor, en relación al clon estable Control (Figura 62). En suma, estos hallazgos sugieren que FKBP51 regula al menos uno de los procesos que intervienen en el delicado equilibrio existente entre la proliferación y la muerte celular.

Se plantean dos posibles hipótesis, no necesariamente excluyentes, sobre el rol de FKBP51 sobre el crecimiento celular:

A) La modulación negativa de FKBP51 sobre la translocación nuclear de c-Fos y la actividad transcripcional de AP-1 podría influir en la regulación positiva que ejerce AP-1 sobre genes que intervienen en la proliferación celular.

B) La función de FKBP51 como proteína de anclaje que media la defosforilación de AKT con la fosfatasa PHLPP. Esta interacción dual es independiente de su actividad PPIasa y resulta en una disminución de los niveles de fosforilación de AKT (Wang, 2011).

La relevancia de la regulación de FKBP51 sobre la vía de señalización PI3K/AKT recae en que esta vía cumple un rol crucial en la proliferación, migración y fusión celular de varios tipos celulares, tales como células trofoblásticas (Vatish, 2012; Yang, 2017; Hu, 2018)

3. Discusión capítulo 3

Uno de los mayores desafíos que presenta el campo de las INMs es el desarrollo de drogas específicas. Hoy en día, los mayores problemas en esta área de estudio, radican en la inespecificidad de las pocas drogas existentes respecto de la INM blanco y la naturaleza inmunosupresora de todas ellas, un efecto indeseado si se proyecta un uso terapéutico. Con excepción de la droga recientemente diseñada SAFit, que inhibe específicamente la actividad PPIasa

de FKBP51, CsA y FK506 actúan en forma no selectiva sobre las proteínas miembro de la familias de CyPs y FKBP, respectivamente.

Para abordar este inconveniente, en esta tesis se ha implementado el uso de flavonoides como recurso alternativo frente a la síntesis de nuevos compuestos. EGCG es un flavonoide capaz de modular la actividad de un gran número de proteínas que intervienen en distintas vías de señalización bioquímica (Williams, 2004). En tal sentido, nos pareció una opción interesante centrar el contenido del Capítulo 3 en el estudio de los efectos de EGCG sobre la acción regulatoria de FKBP52. Para ello, nos enfocamos en determinar cambios en la ya descrita acción regulatoria de FKBP52 sobre los factores nucleares AP-1 y NF-kappaB bajo el estímulo de PMA. Empleamos, para tal propósito, las células HEK-293T y las células trofoblásticas BeWo. El compuesto EGCG se preincubó sin renovación posterior de medio de cultivo fresco, al igual que el macrólido FK506 que fue utilizado como droga control.

Mediante ensayos de gen reportero, se determinó que EGCG inhibe el efecto estimulador que ejerce FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB y AP-1 (Figura 64, Figura 67 y Figura 69). Estos resultados se reprodujeron tanto en células HEK-293T como en células BeWo, indicando que el efecto de EGCG sobre la acción de FKBP52 no es exclusivo de una línea celular, ni de un FT. Cabe mencionar que el efecto inhibitorio de este flavonoide sobre la acción de FKBP52, de incrementar la actividad transcripcional de NF-kappaB, resultó dependiente de la concentración de EGCG (Figura 64). Así, la modulación negativa de EGCG fue efectiva a concentraciones mayores o iguales a 25 μ M. Notablemente, la sobreexpresión de FKBP52 resultó un requisito necesario para que EGCG produzca cambios en la actividad transcripcional de NF-kappaB y AP-1 (Figura 65 y Figura 68). Observamos que la acción de EGCG sobre la acción regulatoria de FKBP52 endógena no llega a generar cambios significativos en la actividad transcripcional de los factores nucleares analizados.

Son numerosas las proteínas dianas de EGCG, ya descritas, que podrían apantallar el efecto del flavonoide (Fang, 2003; Tang, 2003; Van Aller, 2011; Urusova, 2011). No obstante dada la sobreexpresión de la INM, la modulación de EGCG sobre FKBP52 se encontraría favorecida. Un factor que podrían explicar dicho comportamiento de EGCG sería una mayor disponibilidad de la INM.

Al comparar la capacidad regulatoria de otros miembros de la familia de flavan-3-oles, a la cual EGCG pertenece, se observó que los flavonoides con motivo galato (ECG y EGCG) fueron los únicos capaces de inhibir la actividad transcripcional de NF-kappaB modulada por FKBP52 (Figura 66). Este resultado demuestra la relevancia del grupo galato en la inhibición de la acción de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB.

Una vez determinado el efecto de EGCG sobre la acción de FKBP52 a nivel transcripcional, proseguimos a evaluar si los efectos del flavonoide no eran consecuencia de su citotoxicidad celular. Llegado a este punto, es importante tener en cuenta dos consideraciones:

A. Altos niveles de EGCG favorecen una elevada producción de peróxido de hidrógeno como asimismo, la generación de metabolitos modificados que afectan el metabolismo de la glucosa (Nakagawa, 2004; Toniolo, 2013)

B. EGCG disminuye selectivamente la viabilidad de distintos tipos de células tumorales (Shih, 2016).

Apelando al ensayo de MTT, se midió la viabilidad de las células HEK-293T ensayando distintas concentraciones de EGCG durante tiempos cortos (7 h). Transcurrido dicho lapso, se observó que EGCG no afecta la viabilidad de las células HEK-293T a baja concentración (25 μ M). A una concentración mayor de EGCG (50 μ M), se observó una disminución del porcentaje de viabilidad de las células HEK-293T de alrededor de un 25 % (Figura 72). De donde se infiere que el efecto inhibitorio de EGCG sobre la actividad transcripcional modulada por FKBP52 no sería una consecuencia de la citotoxicidad celular causada por el

flavonoide en la línea celular HEK-293T. En lo que refiere a las células BeWo (24 h - 48 h), la viabilidad de este tipo celular se midió a tiempos largos de incubación con EGCG, para reproducir los tiempos de los ensayos funcionales posteriores. Al tratar las células BeWo con EGCG, encontramos variaciones significativas en el número de células, cuya magnitud variaba en función de la concentración y tiempo final de incubación con EGCG. En otras palabras, la viabilidad de las células BeWo decrece conforme mayor es la concentración de EGCG y mayor es el tiempo de incubación. Al cabo de 24 h de tratamiento con EGCG 25 μ M, se detectó una disminución del porcentaje de viabilidad de las células BeWo de alrededor de 12 % (Figura 74).

Considerando el efecto de EGCG sobre la actividad transcripcional de NF-kappaB y AP-1 mediados por FKBP52 en células trofoblásticas BeWo, nos preguntamos por posibles cambios en la expresión de IL-6 y actividad proteolítica de MMP-2. Determinamos que EGCG *per se* no induce cambios significativos sobre los niveles de IL-6 y la actividad proteolítica de MMP-2 (Figura 75). De forma análoga a los ensayos de actividad transcripcional, este resultado es importante para apoyar la hipótesis de que en nuestro modelo la acción moduladora EGCG actúa sobre FKBP52, en lugar de actuar sobre otras proteínas dianas ya reportadas para este flavonoide. Hecha la salvedad, se observó que EGCG reprime la modulación positiva de FKBP52 sobre la cantidad de IL-6 en el medio condicionado, y lo mismo ocurre con la actividad proteolítica de MMP-2 (Figura 76).

Finalmente, mediante análisis de acoplamiento *in silico*, se determinó que EGCG es capaz de interactuar virtualmente con el bolsillo catalítico de FKBP52 (perteneciente al dominio PPIasa de FK1) (Figura 77), con una energía de enlace similar a FK506 (Tabla 4). Esta observación apoya aún más nuestra hipótesis de que EGCG podría actuar como un inhibidor natural de la actividad PPIasa de FKBP52. Para confirmarlo, sería interesante medir *in vitro* los efectos de EGCG sobre la actividad PPIasa de la proteína FKBP52 purificada.

4. Discusión general

Transcurridos casi 40 años desde el descubrimiento de las INMs, todavía existen numerosos aspectos sin resolver acerca de sus mecanismos de acción y de señalización en los que intervienen. Surge, por lo tanto, la necesidad de buscar nuevos interactores y ligandos, de profundizar en el estudio de la relevancia fisiológica de estas proteínas y ahondar en sus posibles aplicaciones terapéuticas. Partiendo de este contexto, el objetivo central de esta Tesis Doctoral ha sido **caracterizar la regulación de una subfamilia de las INMs, las FKBP, sobre los FTs de la familia AP-1.**

Dada la diversidad de miembros del complejo AP-1, decidimos acotar el estudio centrándonos primordialmente sobre c-Fos. En este sentido, nos pareció interesante abordar la regulación de las FKBP sobre c-Fos en el marco de la placenta humana considerando el gran protagonismo que tiene este factor de transcripción sobre la proliferación, migración e invasión de células trofoblásticas humanas. De todas formas, vale aclarar que apelamos al uso alternativo de una línea celular no trofoblástica con la intención de superar dificultades técnicas de los ensayos y obtener una mirada más integral de la regulación de las FKBP.

La Tesis Doctoral se dividió en tres capítulos principales:

En el **Capítulo 1** estudiamos los mecanismos de regulación de FKBP51 y FKBP52 sobre la vía de señalización de c-Fos. Observamos que, bajo el estímulo de PMA, FKBP52 favorece una activación sostenida de la quinasa ERK. El efecto de FKBP52 sobre ERK correlacionó con un incremento de la estabilidad proteica, de la retención nuclear y de los niveles de c-Fos. Asimismo, se demostró que la sobreexpresión de FKBP52 aumenta la unión de AP-1 a secuencias de ADN diana, como también la actividad transcripcional de este FT. En contraste, se encontró que FKBP51 no altera la cinética de activación de ERK, ni produce cambios en la estabilidad o en los niveles de proteína de c-Fos. La

sobreexpresión de esta INM únicamente produjo alteraciones en la localización subcelular de c-Fos y en la actividad de transcripcional de AP-1. En efecto, FKBP51 retrasó la importación nuclear y disminuyó la presencia de c-Fos en el núcleo. Más aún, FKBP51 inhibió la actividad transcripcional de AP-1. Dentro de la variedad de parámetros evaluados, la contribución funcional del dominio PPIasa de ambas FKBP5s resultó relevante en la modulación de AP-1. Más aún, determinamos que el dominio TPR de FKBP52 cumple un importante rol en la modulación de la actividad transcripcional de AP-1. Paralelamente, demostramos que existe una interacción física entre c-Fos y las FKBP5s. Tanto FKBP51 como FKBP52 interaccionan con c-Fos en condiciones basales, siendo únicamente FKBP52 la cual continua asociada a c-Fos *a posteriori* de la incubación con un estímulo como PMA. Finalmente, observamos que la regulación de las FKBP5s sobre los FTs AP-1 no es exclusiva de una línea celular ni estímulo específica.

En el **Capítulo 2** analizamos los efectos biológicos de la regulación de las FKBP5s sobre genes blancos comunes de AP-1 y NF-kappaB, tales como MMPs e IL-6.

En condiciones de sobreexpresión de FKBP52, observamos un claro aumento de los niveles de MMPs (MMP-2 y MMP-9) y un incremento de la actividad proteolítica de MMP-2. Determinamos, también que, FKBP52 incrementa los niveles de IL-6 en el medio condicionado de células BeWo y que su acción regulatoria depende de la actividad enzimática de su dominio PPIasa. En lo que respecta a los efectos de FKBP51, registramos una disminución de los niveles de proteína y actividad proteolítica de MMP-2. A diferencia de FKBP52, la actividad PPIasa de FKBP51 no contribuye funcionalmente al efecto inhibitorio de la INM sobre las MMPs. En contraste, no se detectaron cambios significativos de los niveles de proteína de MMP-9 y de IL-6 en relación al grupo control inducido con PMA. Cabe remarcar que la sobreexpresión de la mutante puntual del dominio PPIasa de FKBP51 o la preincubación con FK506 provocaron una disminución de

los niveles de IL-6. A nivel del crecimiento celular, la sobreexpresión de FKBP51 causó reducción del número de células y colonias.

En el **Capítulo 3** nos focalizamos en la caracterización general de los efectos de EGCG sobre la acción regulatoria de FKBP52.

Se determinó que EGCG inhibe la acción estimuladora que ejerce FKBP52 sobre la actividad transcripcional de AP-1 y NF-kappaB, siendo este efecto efectivo a concentraciones iguales o mayores de 25 μ M de EGCG. La regulación de EGCG sobre la acción de FKBP52 no solo se circunscribió a la actividad transcripcional de NF-kappaB y AP-1, sino también a la expresión de IL-6 y actividad proteolítica de MMP-2 . En todos los casos, la sobreexpresión de FKBP52 resultó ser un requisito necesario para que tenga lugar el efecto inhibitorio de EGCG. Este flavonoide genera citotoxicidad celular dependiendo de su concentración y el tiempo de incubación. Por último, estudios in silico señalan que EGCG se acopla virtualmente al dominio PPIasa activo de FKBP52.

Ateniendo al conjunto de evidencias experimentales expuestas, ideamos un modelo tentativo del mecanismo de regulación de las FKBP5s sobre los distintos niveles de la vía de señalización de los factores de transcripción de AP-1, particularmente c-Fos (Figura 78).

Se postula 3 posibles puntos de regulación, donde las FKBP5s podrían la activación de c-Fos/AP-1:

1. Tras el estímulo del éster de forbol PMA, FKBP52 actuaría a nivel de las quinasas de la cascada de las MAPKs. Se plantea que FKBP52 promueve la activación sostenida de ERK, favoreciendo su translocación al núcleo y la fosforilación de proteínas sustratos. Ciertas proteínas sustratos de ERK intervendrían en la regulación transcripcional de c-fos. Se especula un efecto similar de FKBP52 sobre JNK que aún queda pendiente confirmar.

2. Dado que las FKBP5s están involucradas en la relocalización de factores nucleares, se propone un rol activo de estas proteínas sobre el transporte de c-Fos. Se plantea que FKBP52 y FKBP51 compiten por su interacción con c-Fos. Bajo el estímulo de PMA, FKBP52 desplaza a FKBP51 en su interacción con c-Fos y favorece la importación nuclear del FT, formando un heterocomplejo de proteínas compuesto también por Hsp. La regulación del transporte de c-Fos sería uno de los puntos críticos de modulación de FKBP51 sobre este FT.

3. Las FKBP5s son capaces de translocar al núcleo y modular la actividad transcripcional de numerosos FTs. En el contexto de AP-1, determinamos que las FKBP51 y FKBP52 regulan antagónicamente la actividad transcripcional de AP-1. Resaltamos el rol de FKBP52 como modulador de la actividad transcripcional y del pegado de AP-1 al ADN. Trabajos anteriores del equipo de trabajo validan la participación de FKBP52 en la unión de RelA/NF- κ B a sus secuencias consenso de ADN (Erlejman, 2014).

Dado el estímulo del éster de forbol PMA, ERK y JNK se fosforilan y translocan al núcleo. Ya en el núcleo, ERK actúa sobre proteínas sustratos que favorecen la transcripción de c-fos. Una vez sintetizado c-Fos viaja al núcleo en donde es fosforilado por la quinasa ERK y se activa. En formato de heterodímero, AP-1 regula la transcripción de sus genes blancos (tales como MMPs, IL-6 entre otros) y en virtud de ello, distintos procesos celulares. Las FKBP5s actúan en forma contrapuesta, en distintos niveles de la vía de señalización de AP-1. Por un lado, FKBP52 desencadena una activación sostenida de ERK que conlleva en primer término, a un aumento de los niveles de c-Fos. Favorecida su entrada al núcleo, FKBP52 promueve un incremento de la estabilidad proteica y retención nuclear de c-Fos como también, una mayor unión al ADN (por ejemplo, a las secuencias TRE) y una actividad transcripcional de AP-1 exacerbada. Este conjunto de cambios se acompañan con un incremento de la expresión y funciones biológicas de los genes blancos de dicho FT. Por otro lado, FKBP51

inhibe determinados pasos de activación de AP-1. A nivel de distribución subcelular, retrasa y disminuye la importación nuclear de c-Fos compitiendo con FKBP52. Mientras que a nivel de regulación de genes blancos, FKBP51 reduce la actividad transcripcional de AP-1 y sus funciones biológicas asociadas.

En la búsqueda de compuestos moduladores de la actividad de enzimática de las FKBP5s, se determinó que EGCG inhibe el efecto estimulador de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de AP-1 y NF-kappaB. Se observó, también, que EGCG inhibe la expresión de IL-6 y actividad proteolítica de MMP-2 mediada por la INM. Si bien EGCG actúa sobre múltiples proteínas, parece ser un inhibidor potencial y efectivo de la actividad PPIasa de FKBP52. En este sentido, EGCG ofrece futuras herramientas para dilucidar el mecanismo de acción de FKBP52 en distintos mecanismos biológicos y en algunos casos, utilizarlo para fines terapéuticos en aquellos casos donde la función de FKBP52 está exacerbada.

A nivel de placenta, buscamos develar la importancia de la regulación de las FKBP5s sobre las funciones biológicas que modula AP-1 y NF-kappaB en células trofoblásticas. En este contexto, dos genes blancos de AP-1 y NF-kappaB, las MMPs e IL-6 constituyen factores cruciales en la remodelación de la MEC y vascularización coriónico. La desregulación de MMPs e IL-6 guarda una estrecha relación con el desarrollo de patologías placentarias humanas, tal como la preeclampsia. En tal sentido, creemos que una activación deficiente de AP-1 condicionado por un balance desproporcionado de FKBP51/FKBP52 puede favorecer la disfunción trofoblástica y comprometer la remodelación utero-placentaria.

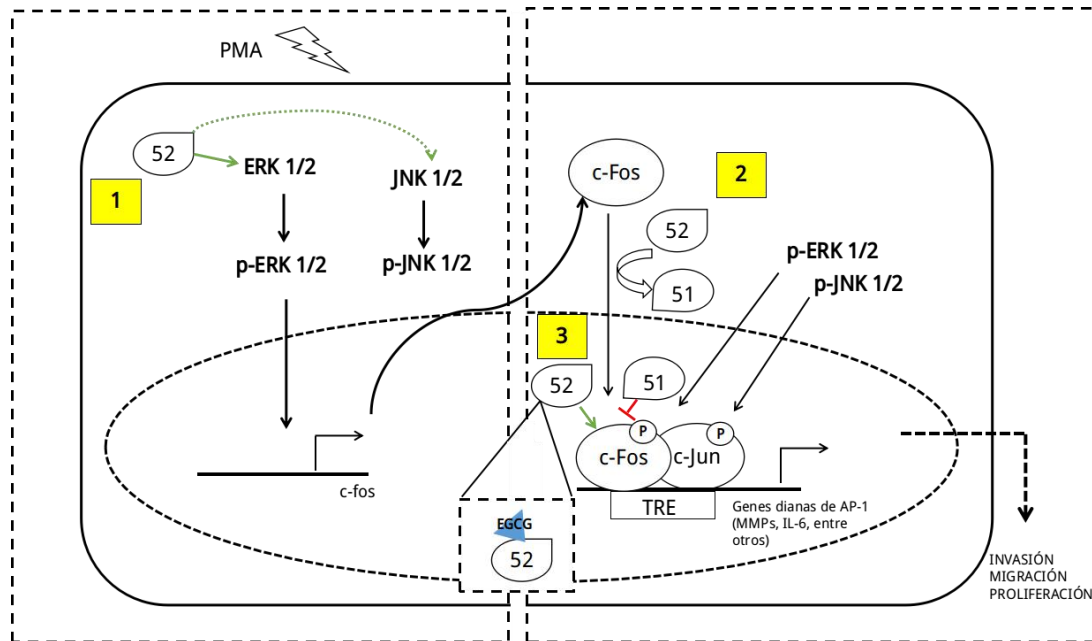


Figura 78. Modelo de la regulación de AP-1 por FKBP

En respuesta a un estímulo, ERK se fosforila y transloca al núcleo, donde por medio de la fosforilación de proteínas dianas, favorece la transcripción de c-fos. Una vez sintetizado, c-Fos también entra al núcleo. Ya en la organela, ERK fosforila a c-Fos estabilizándolo en primera instancia. Tras modificaciones postraduccionales posteriores en el extremo C-terminal de c-Fos mediadas por ERK, c-Fos/AP-1 se une a los promotores de sus genes blancos y regula, distintos procesos celulares. Dentro de este marco, proponemos que las FKBP actuarían en distintos niveles de la vía de señalización de AP-1. Por un lado, FKBP52 (52) promovería la activación sostenida de ERK (1) y por consiguiente, exacerbaría la activación de AP-1. Se destaca el rol modulador de FKBP52 sobre la actividad transcripcional y pegado de AP-1 a sus secuencias consenso de ADN (2). En contraste, FKBP51 (51) modularía negativamente la translocación nuclear de c-Fos (2), la actividad transcripcional de AP-1 (3) y las funciones biológicas en las cuales este factor nuclear está involucrado. El balance final de la regulación de las FKBP sería resultado de los niveles de expresión de ambas IMNs dado que actuarían en forma contrapuesta. El flavonoide EGCG es capaz de acoplarse virtualmente al dominio PPIasa de FKBP52 y regula negativamente el efecto estimulador de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de AP-1.

BIBLIOGRAFÍA

- Aban, M., Cinel, L., Arslan, M., Dilek, U., Kaplanoglu, M., Arpaci, R., & Dilek, S. (2004). Expression of nuclear factor-kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: an immunohistochemical study. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, *204*(3), 195–202.
- Abate, C., Luk, D., & Curran, T. (1991). Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains. *Molecular and Cellular Biology*, *11*(7), 3624–3632.
- Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F., & Kraft, A. S. (1992). Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(24), 17001–17005.
- Agarwal, R., Loganath, A., Roy, A. C., Wong, Y. C., Lindoff, C., & Ng, S. C. (2000). Increased expression of interleukin 6 in term compared to the first trimester human placental villi. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme*, *32*(5), 164–168. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978615>
- Aktas, O., Prozorovski, T., Smorodchenko, A., Savaskan, N. E., Lauster, R., Kloetzel, P.-M., ... Zipp, F. (2004). Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *173*(9), 5794–5800.
- Allport, V. C., Slater, D. M., Newton, R., & Bennett, P. R. (2000). NF-kappaB and AP-1 are required for cyclo-oxygenase 2 gene expression in amnion epithelial cell line (WISH). *Molecular Human Reproduction*, *6*(6), 561–565.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., ... Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, *49*(6), 729–739.
- Angel, P., & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *BBA - Reviews on Cancer*. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(91\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0304-419X(91)90011-9)
- Annabi, B., Lachambre, M.-P., Bousquet-Gagnon, N., Pagé, M., Gingras, D., & Béliveau, R. (2002). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1542*(1), 209–220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(01\)00187-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4889(01)00187-2)
- Auwerx, J., & Sassone-Corsi, P. (1991). IP-1: a dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell*, *64*(5), 983–993.
- Avellino, R., Romano, S., Parasole, R., Bisogni, R., Lamberti, A., Poggi, V., ... Romano, M. F. (2005). Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, *106*(4), 1400–1406. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-0929>
- Babich, H., Zuckerbraun, H. L., & Weirnerman, S. M. (2007). In vitro cytotoxicity of (-)-catechin gallate, a minor polyphenol in green tea. *Toxicology Letters*, *171*(3), 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.05.125>
- Balsalobre, A., & Jolicoeur, P. (1995). Fos proteins can act as negative regulators of cell growth independently of the fos transforming pathway. *Oncogene*, *11*(3), 455–465.

- Bamberger, A.-M., Bamberger, C. M., Aupers, S., Milde-Langosch, K., Loning, T., & Makrigiannakis, A. (2004). Expression pattern of the activating protein-1 family of transcription factors in the human placenta. *Molecular Human Reproduction*, *10*(4), 223–228. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah011>
- Beetz T. Oppel, W. Kaffenberger, R. A. Rupec, M. Meyer, D. Van Beuningen, P. Kind, G. Messer, A., R. U. P. (2000). NF- κ B and AP-1 are responsible for inducibility of the IL-6 promoter by ionizing radiation in HeLa cells. *International Journal of Radiation Biology*, *76*(11), 1443–1453. <https://doi.org/10.1080/09553000050176207>
- Beinke, S., & Ley, S. C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *The Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20040544>
- Benbow, U., & Brinckerhoff, C. E. (1997). The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about? *Matrix Biology*, *15*(8), 519–526. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(97\)90026-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0945-053X(97)90026-3)
- Benkoussa, M., Brand, C., Delmotte, M.-H., Formstecher, P., & Lefebvre, P. (2002). Retinoic Acid Receptors Inhibit AP1 Activation by Regulating Extracellular Signal-Regulated Kinase and CBP Recruitment to an AP1-Responsive Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(13), 4522 LP-4534. Retrieved from <http://mcb.asm.org/content/22/13/4522.abstract>
- Bergers, G., Graninger, P., Braselmann, S., Wrighton, C., & Busslinger, M. (1995). Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(7), 3748–3758.
- Bergman, M. R., Cheng, S., Honbo, N., Piacentini, L., Karliner, J. S., & Lovett, D. H. (2003). A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *The Biochemical Journal*, *369*(Pt 3), 485–496. <https://doi.org/10.1042/BJ20020707>
- Binder, E. B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G. M., Ising, M., Putz, B., ... Muller-Myhsok, B. (2004). Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nature Genetics*, *36*(12), 1319–1325. <https://doi.org/10.1038/ng1479>
- Bischof, P., Meisser, A., & Campana, A. (2002). Control of MMP-9 expression at the maternal-fetal interface. *Journal of Reproductive Immunology*, *55*(1–2), 3–10.
- Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, *87*(7), 1203–1214.
- Blackwell, T. S., & Christman, J. W. (1997). The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *17*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.17.1.f132>
- Bose, S., Weikl, T., Bugl, H., & Buchner, J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5293), 1715–1717.

- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radzilewska, E., Morgenbesser, S. D., ... Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90098-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90098-J)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
- Brown, H. J., Sutherland, J. A., Cook, A., Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (1995). An inhibitor domain in c-Fos regulates activation domains containing the HOB1 motif. *The EMBO Journal*, *14*(1), 124–131.
- Bruna, A., Nicolas, M., Munoz, A., Kyriakis, J. M., & Caelles, C. (2003). Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *The EMBO Journal*, *22*(22), 6035–6044. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg590>
- Brusselbach, S., Mohle-Steinlein, U., Wang, Z. Q., Schreiber, M., Lucibello, F. C., Muller, R., & Wagner, E. F. (1995). Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene*, *10*(1), 79–86.
- Buscà, R., Pouyssegur, J., & Lenormand, P. (2016). ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053>
- Cao, W., & Konsolaki, M. (2011). FKBP immunophilins and Alzheimer's disease: A chaperoned affair. *Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9080-7>
- Carter, D. A. (1997). Modulation of cellular AP-1 DNA binding activity by heat shock proteins. *FEBS Letters*, *416*(1), 81–85.
- Cauwe, B., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2007). The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *42*(3), 113–185. <https://doi.org/10.1080/10409230701340019>
- Chalmers, C. J., Gilley, R., March, H. N., Balmanno, K., & Cook, S. J. (2007). The duration of ERK1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cellular Signalling*, *19*(4), 695–704. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.09.001>
- Chambraud, B., Sardin, E., Giustiniani, J., Dounane, O., Schumacher, M., Goedert, M., & Baulieu, E.-E. (2010). A role for FKBP52 in Tau protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(6), 2658–2663. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914957107>
- Chaouat, G., Ledee-Bataille, N., Dubanchet, S., Zourbas, S., Sandra, O., & Martal, J. (2004). TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *International Archives of Allergy and Immunology*, *134*(2), 93–119. <https://doi.org/10.1159/000074300>
- Chen, D. Y., Deutsch, J. A., Gonzalez, M. F., & Gu, Y. (1993). The induction and suppression of c-fos expression in the rat brain by cholecystokinin and its antagonist L364,718. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90355-O](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90355-O)

- Chen, H., Yong, W., Hinds, T. D., Yang, Z., Zhou, Y., Sanchez, E. R., & Shou, W. (2010). Fkbp52 regulates androgen receptor transactivation activity and male urethra morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.156091>
- Chen, H. Y., Li, O. Y., Pang, L. H., Xu, H., Fan, X. J., Liang, H. F., ... Deng, B. Y. (2015). Expression of FK506-binding protein 52 (FKBP52) in chorionic villi with early recurrent spontaneous abortion. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.947572>
- Chen, K., Vita, J. A., Berk, B. C., & Keaney, J. F. (2001). c-Jun N-terminal Kinase Activation by Hydrogen Peroxide in Endothelial Cells Involves Src-dependent Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011766200>
- Cheng, X. W., Kuzuya, M., Nakamura, K., Liu, Z., Di, Q., Hasegawa, J., ... Iguchi, A. (2005). Mechanisms of the inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate on cultured human vascular smooth muscle cell invasion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(9), 1864–1870. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000179675.49619.9b>
- Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Cox, M. B., Riggs, D. L., Suarez-Quian, C., & Smith, D. F. (2005). Physiological Role for the Cochaperone FKBP52 in Androgen Receptor Signaling. *Molecular Endocrinology*.
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0071>
- Chinenov, Y., & Kerppola, T. K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204385>
- Christner, C., Wyrwa, R., Marsch, S., Küllertz, G., Thiericke, R., Grabley, S., ... Fischer, G. (1999). Synthesis and cytotoxic evaluation of cycloheximide derivatives as potential inhibitors of FKBP12 with neuroregenerative properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jm991038t>
- Clark, I. M., Swingler, T. E., Sampieri, C. L., & Edwards, D. R. (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6–7), 1362–1378.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.006>
- Clark, I. M., Swingler, T. E., Sampieri, C. L., & Edwards, D. R. (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.006>
- Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J. H., Shoji, M., Sexton, D. G., Cotsonis, G., ... Arbiser, J. L. (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*.
- Cox, M. B., Riggs, D. L., Hessling, M., Schumacher, F., Buchner, J., & Smith, D. F. (2007). FK506-binding protein 52 phosphorylation: a potential mechanism for regulating steroid hormone receptor activity. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0547>
- Cuenda, A., Lizcano, J. M., & Lozano, J. (2017). Editorial: Mitogen Activated Protein Kinases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 80. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00080>

- Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>
- Curran, T., & Franza, B. R. J. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*, *55*(3), 395–397.
- Curran, T., Peters, G., Van Beveren, C., Teich, N. M., & Verma, I. M. (1982). FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *Journal of Virology*.
- Dahmer, M. K., Housley, P. R., & Pratt, W. B. (1984). Effects of Molybdate and Endogenous Inhibitors on Steroid-Receptor Inactivation, Transformation, and Translocation. *Annual Review of Physiology*, *46*(1), 67–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.46.030184.000435>
- Deng, T., & Karin, M. (1994). C-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/371171a0>
- Dobrzanski, P., Noguchi, T., Kovary, K., Rizzo, C. A., Lazo, P. S., & Bravo, R. (1991). Both products of the fosB gene, FosB and its short form, FosB/SF, are transcriptional activators in fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, *11*(11), 5470–5478.
- Dong, Z., Ma, W., Huang, C., & Yang, C. S. (1997). Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins. *Cancer Research*, *57*(19), 4414–4419.
- Dwyer, J. T., & Peterson, J. (2013). Tea and flavonoids: where we are, where to go next. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(6), 1611S–1618S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.059584>
- Echeverria, P. C., Mazaira, G., Erlejman, A., Gomez-Sanchez, C., Pilipuk, G. P., & Galigniana, M. D. (2009). Nuclear Import of the Glucocorticoid Receptor-hsp90 Complex through the Nuclear Pore Complex Is Mediated by Its Interaction with Nup62 and Importin . *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.00649-09>
- Eferl, R., Hasselblatt, P., Rath, M., Popper, H., Zenz, R., Komnenovic, V., ... Wagner, E. F. (2008). Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(30), 10525–10530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801414105>
- Eferl, R., & Wagner, E. F. (2003). AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1209>
- Elbi, C., Walker, D. a, Romero, G., Sullivan, W. P., Toft, D. O., Hager, G. L., & DeFranco, D. B. (2004). Molecular chaperones function as steroid receptor nuclear mobility factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400116101>
- Erlejman, A. G., De Leo, S. A., Mazaira, G. I., Molinari, A. M., Camisay, M. F., Fontana, V., ... Galigniana, M. D. (2014). NF-κB transcriptional activity is modulated by FK506-Binding proteins FKBP51 and FKBP52: A role for peptidyl-prolyl isomerase activity. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.582882>

- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.3283939>
- Fang, M. Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., ... Yang, C. S. (2003). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Research*, 63(22), 7563–7570.
- Feng, W., Cherednichenko, G., Ward, C. W., Padilla, I. T., Cabrales, E., Lopez, J. R., ... Pessah, I. N. (2010). Green tea catechins are potent sensitizers of ryanodine receptor type 1 (RyR1). *Biochemical Pharmacology*, 80(4), 512–521.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.05.004>
- Fey, D., Croucher, D. R., Kolch, W., & Kholodenko, B. N. (2012). Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Frontiers in Physiology*, 3, 355. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00355>
- Fisch, T. M., Prywes, R., Simon, M. C., & Roeder, R. G. (1989). Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes & Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.3.2.198>
- Fischer, G., Bang, H., & Mech, C. (1984). [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomedica biochimica acta*, 43(10), 1101–1111.
- Foletta, V. C., Sonobe, M. H., Suzuki, T., Endo, T., Iba, H., & Cohen, D. R. (1994). Cloning and characterisation of the mouse fra-2 gene. *Oncogene*.
- Fontana, V., Silva, P. S., Gerlach, R. F., & Tanus-Santos, J. E. (2012). Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 413(7–8), 656–662.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.12.021>
- Fujisawa, K., Nasu, K., Arima, K., Sugano, T., Narahara, H., & Miyakawa, I. (2000). Production of interleukin (IL)-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. *Placenta*, 21(4), 354–360. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0494>
- Gaali, S., Kirschner, A., Cuboni, S., Hartmann, J., Kozany, C., Balsevich, G., ... Hausch, F. (2015). Selective inhibitors of the FK506-binding protein 51 by induced fit. *Nature Chemical Biology*, 11(1), 33–37.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1699>
- GALAT, A. (1993). Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *European Journal of Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18189.x>
- Galigniana, M. D., Erlejman, A. G., Monte, M., Gomez-Sanchez, C., & Piwien-Pilipuk, G. (2010). The hsp90-FKBP52 Complex Links the Mineralocorticoid Receptor to Motor Proteins and Persists Bound to the Receptor in Early Nuclear Events. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.01190-09>
- Galigniana, M. D., Echeverría, P. C., Erlejman, A. G., & Piwien-Pilipuk, G. (2010). Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus*. <https://doi.org/10.4161/nucl.1.4.11743>

- Galigniana, M. D., Harrell, J. M., Murphy, P. J. M., Chinkers, M., Radanyi, C., Renoir, J. M., ... Pratt, W. B. (2002). Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: Direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi020399z>
- Galigniana, M. D., Harrell, J. M., O'Hagen, H. M., Ljungman, M., & Pratt, W. B. (2004). Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402223200>
- Galigniana, M. D., Radanyi, C., Renoir, J. M., Housley, P. R., & Pratt, W. B. (2001). Evidence that the Peptidylprolyl Isomerase Domain of the hsp90-binding Immunophilin FKBP52 is Involved in Both Dynein Interaction and Glucocorticoid Receptor Movement to the Nucleus. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010809200>
- Garces de Los Fayos Alonso, I., Liang, H. C., Turner, S. D., Lagger, S., Merkel, O., & Kenner, L. (2018). The role of activator protein-1 (AP-1) family members in CD30-positive lymphomas. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers10040093>
- Gill, S. E., & Parks, W. C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.024>
- Ginty, D. D., Bonni, A., & Greenberg, M. E. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90055-8)
- Giustiniani, J., Chambraud, B., Sardin, E., Dounane, O., Guillemeau, K., Nakatani, H., ... Tawk, M. (2014). Immunophilin FKBP52 induces Tau-P301L filamentous assembly in vitro and modulates its activity in a model of tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4584–4589. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402645111>
- Glover, J. N. M., & Harrison, S. C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos–c-Jun bound to DNA. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/373257a0>
- Goebel, M., & Yanagida, M. (1991). The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90070-C](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90070-C)
- Gomez, N., Erazo, T., & Lizcano, J. M. (2016). ERK5 and Cell Proliferation: Nuclear Localization Is What Matters. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00105>
- Gonzalez, G. A., Yamamoto, K. K., Fischer, W. H., Karr, D., Menzel, P., Biggs, W. 3rd, ... Montminy, M. R. (1989). A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature*, 337(6209), 749–752. <https://doi.org/10.1038/337749a0>
- Gonzalez, J. M., Navarro-Puche, A., Casar, B., Crespo, P., & Andres, V. (2008). Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *The Journal of Cell Biology*, 183(4), 653–666. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805049>

- González, J. M., Navarro-Puche, A., Casar, B., Crespo, P., & Andrés, V. (2008). Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200805049>
- Greenberg, M. E., Greene, L. A., & Ziff, E. B. (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*.
- Grummer, R., Hohn, H. P., Mareel, M. M., & Denker, H. W. (1994). Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. *Placenta*, 15(4), 411–429.
- Grümmer, R., Hohn, H.-P., & Denker, H.-W. (1990). Choriocarcinoma Cell Spheroids: An In Vitro Model for the Human Trophoblast. In H.-W. Denker & J. D. Aplin (Eds.), *Trophoblast Invasion and Endometrial Receptivity: Novel Aspects of the Cell Biology of Embryo Implantation* (pp. 97–111). Boston, MA: Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0615-3_5
- Güller, M., Toualbi-Abed, K., Legrand, A., Michel, L., Mauviel, A., Bernuau, D., & Daniel, F. (2008). c-Fos overexpression increases the proliferation of human hepatocytes by stabilizing nuclear Cyclin D1. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 14(41), 6339–6346. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.6339>
- Gutierrez, G., Sarto, A., Berod, L., Canellada, A., Gentile, T., Pasqualini, S., & Margni, R. A. (2004). Regulation of interleukin-6 fetoplacental levels could be involved in the protective effect of low-molecular weight heparin treatment on murine spontaneous abortion. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 51(2), 160–165.
- Gutman, A., & Wasylyk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *The EMBO Journal*, 9(7), 2241–2246. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC551948/>
- Gutman, A., Wasylyk, C., & Wasylyk, B. (1991). Cell-specific regulation of oncogene-responsive sequences of the c-fos promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 11(10), 5381–5387.
- Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., ... Montminy, M. (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell*, 70(1), 105–113.
- Hanes, S. D. (2015). Prolyl isomerases in gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.028>
- Harrell, J. M., Murphy, P. J. M., Morishima, Y., Chen, H., Mansfield, J. F., Galigniana, M. D., & Pratt, W. B. (2004). Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M406863200>
- He, H., & Ping, F. (2009). The SIE, SRE, CRE, and FAP-1 four intracellular signal pathways between stimulus and the expression of c-fos promoter. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.22058>

- Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews*, 28(3), 370–490. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00018-6)
- Herschman, H. R. (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annual Review of Biochemistry*, 60, 281–319. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001433>
- Hess, J. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.01589>
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., & Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & Development*, 7(11), 2135–2148.
- Hill, C. S., & Treisman, R. (1995). Transcriptional Regulation by Extracellular signals: Mechanisms and Specificity. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90403-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90403-4)
- Hinz, M., Broemer, M., Arslan, S. Ç., Otto, A., Mueller, E. C., Dettmer, R., & Scheidereit, C. (2007). Signal responsiveness of IκB kinases is determined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705785200>
- Hirota, Y., Acar, N., Tranguch, S., Burnum, K. E., Xie, H., Kodama, A., ... Dey, S. K. (2010). Uterine FKBP52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15577–15582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009324107>
- Hirota, Y., Tranguch, S., Daikoku, T., Hasegawa, A., Osuga, Y., Taketani, Y., & Dey, S. K. (2008). Deficiency of immunophilin FKBP52 promotes endometriosis. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080527>
- Hong, C., Li, T., Zhang, F., Wu, X., Chen, X., Cui, X., ... Cui, Y. (2017). Elevated FKBP52 expression indicates a poor outcome in patients with breast cancer. *Oncology Letters*, 14(5), 5379–5385. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6828>
- Hong, J., Kim, S. T., Tranguch, S., Smith, D. F., & Dey, S. K. (2007). Deficiency of co-chaperone immunophilin FKBP52 compromises sperm fertilizing capacity. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0180>
- Horowitz, D. S., Lee, E. J., Mabon, S. A., & Misteli, T. (2002). A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal*, 21(3), 470–480.
- Hoshi, M., Nishida, E., & Sakai, H. (1989). Characterization of a mitogen-activated, Ca²⁺-sensitive microtubule-associated protein-2 kinase. *European Journal of Biochemistry*, 184(2), 477–486.
- Hu, X., Luo, J., Lai, H., Li, M., Zheng, X., Nie, T., ... Li, H. (2018). Knockdown of Trna1ap inhibits the proliferation and migration of NIH3T3, JEG-3 and Bewo cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.065>

- Hung, T.-C., Chang, T.-T., Fan, M.-J., Lee, C.-C., & Chen, C. Y.-C. (2014). In Silico Insight into Potent of Anthocyanin Regulation of FKBP52 to Prevent Alzheimer's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2014, 450592. <https://doi.org/10.1155/2014/450592>
- Hungness, E. S., Luo, G.-J., Pritts, T. A., Sun, X., Robb, B. W., Hershko, D., & Hasselgren, P.-O. (2002). Transcription factors C/EBP-beta and -delta regulate IL-6 production in IL-1beta-stimulated human enterocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 64–70. <https://doi.org/10.1002/jcp.10116>
- Hunter, T., & Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90162-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90162-6)
- Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *Journal of Clinical Pathology*, 61(12), 1296–1302. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.055277>
- Hussain, A. A., Lee, Y., Zhang, J.-J., Francis, P. T., & Marshall, J. (2017). Disturbed Matrix Metalloproteinase Pathway in Both Age-Related Macular Degeneration and Alzheimer's Disease . *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 2017, 4810232. <https://doi.org/10.1155/2017/4810232>
- Hwang, J.-T., Ha, J., Park, I.-J., Lee, S.-K., Baik, H. W., Kim, Y. M., & Park, O. J. (2007). Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Letters*, 247(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.03.030>
- Imai, K., Ohuchi, E., Aoki, T., Nomura, H., Fujii, Y., Sato, H., ... Okada, Y. (1996). Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Research*, 56(12), 2707–2710.
- Ivorra, C., Kubicek, M., Gonzalez, J. M., Sanz-Gonzalez, S. M., Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.-E., ... Andres, V. (2006). A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes & Development*, 20(3), 307–320. <https://doi.org/10.1101/gad.349506>
- Janknecht, R. (1995). Regulation of the c-fos promoter. *Immunobiology*, 193(2–4), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80536-X](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80536-X)
- Janknecht, R., & Hunter, T. (1997). Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *The EMBO Journal*, 16(7), 1620–1627. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.7.1620>
- Jiang, W., Cazacu, S., Xiang, C., Zenklusen, J. C., Fine, H. A., Berens, M., ... Mikkelsen, T. (2008). FK506 binding protein mediates glioma cell growth and sensitivity to rapamycin treatment by regulating NF-kappaB signaling pathway. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 10(3), 235–243.
- Jinwal, U. K., Koren, J., Borysov, S. I., Schmid, A. B., Abisambra, J. F., Blair, L. J., ... Dickey, C. A. (2010). The Hsp90 cochaperone, FKBP51, increases tau stability and polymerizes microtubules. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(2), 591–599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4815-09.2010>

- Jochum, W., Passequé, E., & Wagner, E. F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204389>
- Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science (New York, N.Y.)*. <https://doi.org/10.1126/science.1072682>
- Johnson, G. L., & Nakamura, K. (2007). The c-Jun Kinase/Stress-activated Pathway: Regulation, Function and Role in Human Disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(8), 1341–1348. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.12.009>
- Junttila, M. R., Li, S.-P., & Westermark, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7859rev>
- Kameda, T., Matsuzaki, N., Sawai, K., Okada, T., Saji, F., Matsuda, T., ... Tanizawa, O. (1990). Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta*, 11(3), 205–213.
- KANAITSUKA, T., ITANI, K., SHIGETA, H., YAMAMURA, Y., KOGAWA, T., YOSHIKAWA, T., ... ASHIHARA, T. (1987). A Case report of giant retroperitoneal hemolympangioma. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, 76(10), 1595–1603.
<https://doi.org/10.2169/naika.76.1595>
- Karin, M., & Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(95\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00151-5)
- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/ni0302-221>
- Karin, M., Liu, Z. G., & Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*.
[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80068-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80068-3)
- Kent, L. N., Rumi, M. A. K., Kubota, K., Lee, D.-S., & Soares, M. J. (2011). FOSL1 Is Integral to Establishing the Maternal-Fetal Interface. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.05780-11>
- Kim, H.-S., Montana, V., Jang, H.-J., Parpura, V., & Kim, J. (2013). Epigallocatechin gallate (EGCG) stimulates autophagy in vascular endothelial cells: a potential role for reducing lipid accumulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22693–22705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.477505>
- Kniss, D. A., Rovin, B., Fertel, R. H., & Zimmerman, P. D. (2001). Blockade NF-kappaB activation prohibits TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 gene expression in ED27 trophoblast-like cells. *Placenta*, 22(1), 80–89.
<https://doi.org/10.1053/plac.2000.0591>
- Knöfler, M., & Pollheimer, J. (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: A particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00190>
- Kolch, W., Heidecker, G., Lloyd, P., & Rapp, U. R. (1991). Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature*, 349, 426. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/349426a0>

- Kondo, T., Ohta, T., Igura, K., Hara, Y., & Kaji, K. (2002). Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. *Cancer Letters*, *180*(2), 139–144.
- Kost, S. L., Smith, D. F., Sullivan, W. P., Welch, W. J., & Toft, D. O. (1989). Binding of heat shock proteins to the avian progesterone receptor. *Molecular and Cellular Biology*, *9*(9), 3829–3838.
- Kovacs, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*(6), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>
- Kumazoe, M., Sugihara, K., Tsukamoto, S., Huang, Y., Tsurudome, Y., Suzuki, T., ... Tachibana, H. (2013). 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(2), 787–799. <https://doi.org/10.1172/JCI64768>
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>
- Lappas, M., Permezel, M., Georgiou, H. M., & Rice, G. E. (2002). Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. *Biology of Reproduction*, *67*(2), 668–673.
- Lee, M.-J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F. Y., Prabhu, S., ... Yang, C. S. (2002). Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *11*(10 Pt 1), 1025–1032.
- Lee, W. Y., Butler, A. P., Locniskar, M. F., & Fischer, S. M. (1994). Signal transduction pathway(s) involved in phorbol ester and autocrine induction of interleukin-1 alpha mRNA in murine keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(27), 17971–17980.
- Lee, W., Mitchell, P., & Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90612-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90612-X)
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., & Ahn, N. G. (1998). Signal Transduction through MAP Kinase Cascades. *Advances in Cancer Research*. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60765-4](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60765-4)
- Li, J., Zeng, Q., Zhang, Y., Li, X., Hu, H., Miao, X., ... Wang, R. (2016). Neurokinin-1 receptor mediated breast cancer cell migration by increased expression of MMP-2 and MMP-14. *European Journal of Cell Biology*, *95*(10), 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.07.005>
- Li, T.-K., Baksh, S., Cristillo, A. D., & Bierer, B. E. (2002). Calcium- and FK506-independent interaction between the immunophilin FKBP51 and calcineurin. *Journal of Cellular Biochemistry*, *84*(3), 460–471.

- Lim, K. H., Zhou, Y., Janatpour, M., McMaster, M., Bass, K., Chun, S. H., & Fisher, S. J. (1997). Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *The American Journal of Pathology*, *151*(6), 1809–1818.
- Lim, K. J., Odukoya, O. A., Li, T. C., & Cooke, I. D. (1996). Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. *Human Reproduction Update*, *2*(6), 469–481.
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., al-Alawi, N., Kikkawa, U., ... Karin, M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell*, *70*(5), 777–789.
- Liou, Y.-C., Zhou, X. Z., & Lu, K. P. (2011). Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *36*(10), 501–514. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.07.001>
- Liu, F., Soares, M. J., & Audus, K. L. (1997). Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo. *The American Journal of Physiology*, *273*(5 Pt 1), C1596-604.
- Lopez-Bergami, P., & Ronai, Z. (2008). Requirements for PKC-augmented JNK activation by MKK4/7. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(5), 1055–1064. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.011>
- Lunghi, L., Ferretti, M. E., Medici, S., Biondi, C., & Vesce, F. (2007). Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, *5*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-6>
- Mahner, S., Baasch, C., Schwarz, J., Hein, S., Wölber, L., Jänicke, F., & Milde-Langosch, K. (2008). C-Fos expression is a molecular predictor of progression and survival in epithelial ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer*, *99*(8), 1269–1275. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604650>
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., ... Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-X)
- Martin, H., Flandez, M., Nombela, C., & Molina, M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Molecular Microbiology*, *58*(1), 6–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04822.x>
- Marzioni, D., Todros, T., Cardaropoli, S., Rolfo, A., Lorenzi, T., Ciarmela, P., ... Castellucci, M. (2010). Activating protein-1 family of transcription factors in the human placenta complicated by preeclampsia with and without fetal growth restriction. *Placenta*. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.08.001>
- Matsuo, N., Yamada, K., Yamashita, K., Shoji, K., Mori, M., & Sugano, M. (1996). Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B4 release from rat peritoneal exudate cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, *32*(6), 340–344.
- Mazaira, G. I., Camisay, M. F., De Leo, S., Erlejman, A. G., & Galigniana, M. D. (2016). Biological relevance of Hsp90-binding immunophilins in cancer development and treatment. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.29509>

- Mikula, M., Gotzmann, J., Fischer, A. N. M., Wolschek, M. F., Thallinger, C., Schulte-Hermann, R., ... Mikulits, W. (2003). The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis. *Oncogene*, 22(43), 6725–6738. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206781>
- Mittelstadt, M. L., & Patel, R. C. (2012). AP-1 mediated transcriptional repression of matrix metalloproteinase-9 by recruitment of histone deacetylase 1 in response to interferon β . *PLoS One*, 7(8), e42152–e42152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042152>
- Miyata, Y., Chambrud, B., Radanyi, C., Leclerc, J., Lebeau, M. C., Renoir, J. M., ... Baulieu, E. E. (1997). Phosphorylation of the immunosuppressant FK506-binding protein FKBP52 by casein kinase II: regulation of HSP90-binding activity of FKBP52. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14500>
- Molina, M., Cid, V. J., & Martin, H. (2010). Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast (Chichester, England)*, 27(8), 503–511. <https://doi.org/10.1002/yea.1791>
- Monje, P., Marinissen, M. J., & Gutkind, J. S. (2003). Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.19.7030-7043.2003>
- Morgan, J. (1991). Stimulus-Transcription Coupling In The Nervous System: Involvement Of The Inducible Proto-oncogenes fos And jun. *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.14.1.421>
- Mukaide, H., Adachi, Y., Taketani, S., Iwasaki, M., Koike-Kiryama, N., Shigematsu, A., ... Ikehara, S. (2008). FKBP51 expressed by both normal epithelial cells and adenocarcinoma of colon suppresses proliferation of colorectal adenocarcinoma. *Cancer Investigation*, 26(4), 385–390. <https://doi.org/10.1080/07357900701799228>
- Murata, M., Miura, Y., Hashiramoto, A., Kitamura, H., Kawasaki, H., Shiozawa, K., ... Shiozawa, S. (2005). Heat shock protein 90 is required for increased DNA binding activity of activator protein-1, a heterodimer of Fos/JunD, in rheumatoid synovial cells under inflammatory stimuli. *International Journal of Molecular Medicine*, 15(4), 649–653.
- Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., & Blenis, J. (2002). Molecular, interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb822>
- Muslin, A. J. (2008). MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 115(7), 203–218. <https://doi.org/10.1042/CS20070430>
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
- Nakada, M., Okada, Y., & Yamashita, J. (2003). The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 8, e261-9.

- Nakagawa, H., Hasumi, K., Woo, J.-T., Nagai, K., & Wachi, M. (2004). Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis*, 25(9), 1567–1574. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh168>
- Nakamura, N., Shimaoka, Y., Tougan, T., Onda, H., Okuzaki, D., Zhao, H., ... Ochi, T. (2006). Isolation and expression profiling of genes upregulated in bone marrow-derived mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 13(4), 169–183. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsl006>
- Obiekwe, B. C., Sturdee, D., Cockrill, B. L., & Chard, T. (1984). Human placental lactogen in pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 91(11), 1077–1080.
- Okazaki, K., & Sagata, N. (1995). The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *The EMBO Journal*, 14(20), 5048–5059.
- Omran, O. M., Shokry, M., Ismail, H., Omar, G., & Rezk, M. (2011). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human trophoblasts of normal and preeclamptic placentas. *International Journal of Health Sciences*, 5(2 Suppl 1), 21–23.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2125>
- Pai, S. R., & Bird, R. C. (1994). c-fos expression is required during all phases of the cell cycle during exponential cell proliferation. *Anticancer Research*, 14(3A), 985–994.
- Papavassiliou, A. G. (1993). c-Jun phosphorylation in signal transduction and gene regulation. *Anticancer Research*, 13(6A), 2213–2220.
- Passegué, E., & Wagner, E. F. (2000). JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *The EMBO Journal*, 19(12), 2969–2979. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2969>
- Pattillo, R. A., & Gey, G. O. (1968). The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Research*, 28(7), 1231–1236.
- Pellegrino, M. J., & Stork, P. J. S. (2006). Sustained activation of extracellular signal-regulated kinase by nerve growth factor regulates c-fos protein stabilization and transactivation in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04250.x>
- Perkins, K. K., Dailey, G. G. M., & Tjian, R. (1988). Novel Jun- and Fos-related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP-1. *The EMBO Journal*.
- Peters, T. J., Chapman, B. M., Wolfe, M. W., & Soares, M. J. (2000). Placental lactogen-I gene activation in differentiating trophoblast cells: extrinsic and intrinsic regulation involving mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *The Journal of Endocrinology*, 165(2), 443–456.

- Pfarr, C. M., Mechta, F., Spyrou, G., Lallemand, D., Carillo, S., & Yaniv, M. (1994). Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell*, 76(4), 747–760.
- Pirkkl, F., & Buchner, J. (2001). Functional analysis of the hsp90-associated human peptidyl prolyl Cis/Trans isomerases FKBP51, FKBP52 and cyp4011 Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 308(4), 795–806.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4595>
- Pirkkl, F., Fischer, E., Modrow, S., & Buchner, J. (2001). Localization of the Chaperone Domain of FKBP52. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102595200>
- Pratt, W. B., Scherrer, L. C., Hutchison, K. A., & Dalman, F. C. (1992). A model of glucocorticoid receptor unfolding and stabilization by a heat shock protein complex. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3–8), 223–229.
- Pratt, W. B., & Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.3.0303>
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., & Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 353(6345), 670–674. <https://doi.org/10.1038/353670a0>
- Quintá, H. R., Maschi, D., Gomez-Sanchez, C., Piwien-Pilipuk, G., & Galigniana, M. D. (2010). Subcellular rearrangement of hsp90-binding immunophilins accompanies neuronal differentiation and neurite outgrowth. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06970.x>
- Radzicka, A., & Wolfenden, R. (1996). Rates of Uncatalyzed Peptide Bond Hydrolysis in Neutral Solution and the Transition State Affinities of Proteases. *Journal of the American Chemical Society*, 118(26), 6105–6109.
<https://doi.org/10.1021/ja954077c>
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392>
- Rao, A., Luo, C., & Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.707>
- Rasmussen, R., Benvegna, D., O'Shea, E. K., Kim, P. S., & Alber, T. (1991). X-ray scattering indicates that the leucine zipper is a coiled coil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.2.561>
- Rauscher, F. J., Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J., & Spiegelman, B. M. (1988). Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell*. [https://doi.org/S0092-8674\(88\)80039-4](https://doi.org/S0092-8674(88)80039-4) [pii]
- Rauscher, F. J., Voulalas, P. J., Franza, B. R., & Curran, T. (1988). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes & Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.2.12b.1687>

- Renaud, S. J., Kubota, K., Rumi, M. A. K., & Soares, M. J. (2014). The FOS transcription factor family differentially controls trophoblast migration and invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 5025–5039.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523746>
- Riggs, D. L., Cox, M. B., Tardif, H. L., Hessling, M., Buchner, J., & Smith, D. F. (2007). Noncatalytic Role of the FKBP52 Peptidyl-Prolyl Isomerase Domain in the Regulation of Steroid Hormone Signaling. *Molecular and Cellular Biology*.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00985-07>
- Risco, A., & Cuenda, A. (2012). New Insights into the p38 γ and p38 δ MAPK Pathways. *Journal of Signal Transduction*.
<https://doi.org/10.1155/2012/520289>
- Robertson, L. M., Kerppola, T. K., Vendrell, M., Luk, D., Smeyne, R. J., Bocchiaro, C., ... Curran, T. (1995). Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. *Neuron*, 14(2), 241–252.
- Romano, S., Xiao, Y., Nakaya, M., D'Angelillo, A., Chang, M., Jin, J., ... Sun, S.-C. (2015). FKBP51 employs both scaffold and isomerase functions to promote NF-kappaB activation in melanoma. *Nucleic Acids Research*, 43(14), 6983–6993. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv615>
- Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncology Reports*, 21(5), 1323–1333.
- Rosen, T., Krikun, G., Ma, Y., Wang, E. Y., Lockwood, C. J., & Guller, S. (1998). Chronic antagonism of nuclear factor-kappaB activity in cytotrophoblasts by dexamethasone: a potential mechanism for antiinflammatory action of glucocorticoids in human placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(10), 3647–3652.
<https://doi.org/10.1210/jcem.83.10.5151>
- Roux, P., Blanchard, J. M., Fernandez, A., Lamb, N., Jeanteur, P., & Piechaczyk, M. (1990). Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90167-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90167-D)
- Rubio, N., Rojo, P., & Torres, C. (1996). Overexpression of basal c-fos and c-jun but not of ras oncogenes after Theiler's murine encephalomyelitis virus infection of glial cells. *Journal of Neurovirology*, 2(3), 167–174.
- Runkel, L., Shaw, P. E., Herrera, R. E., Hipskind, R. A., & Nordheim, A. (1991). Multiple basal promoter elements determine the level of human c-fos transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 11(3), 1270–1280. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC369398/>
- Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S. Y., Bauer, A., Karin, M., & Wagner, E. F. (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Molecular Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.028>
- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., & Abraham, R. T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(2), 815–822.

- Sah, J. F., Balasubramanian, S., Eckert, R. L., & Rorke, E. A. (2004). Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12755–12762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312333200>
- Sambucetti, L. C., & Curran, T. (1986). The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.3491427>
- Sanchez, E. R. (1990). Hsp56: A novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *Journal of Biological Chemistry*.
- Sandberg, A., Johansson, D. G. A., Macao, B., & Hård, T. (2008). SEA Domain Autoproteolysis Accelerated by Conformational Strain: Energetic Aspects. *Journal of Molecular Biology*, 377(4), 1117–1129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.051>
- Santen, R. J., Song, R. X., McPherson, R., Kumar, R., Adam, L., Jeng, M.-H., & Yue, W. (2002). The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00189-3](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00189-3)
- Sasaki, T., Kojima, H., Kishimoto, R., Ikeda, A., Kunimoto, H., & Nakajima, K. (2006). Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role. *Molecular Cell*, 24(1), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.005>
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C., & Verma, I. M. (1988). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature*, 334, 314. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/334314a0>
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90807-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90807-X),
- Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.005>
- Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e131>
- Shaulian, E., & Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204383>
- Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A., & Crabtree, G. R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4862), 202–205.
- Shih, L.-J., Lin, Y.-R., Lin, C.-K., Liu, H.-S., & Kao, Y.-H. (2016). Green tea (-)-epigallocatechin gallate induced growth inhibition of human placental choriocarcinoma cells. *Placenta*, 41, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.02.017>

- Shimonovitz, S., Hurwitz, A., Dushnik, M., Anteby, E., Geva-Eldar, T., & Yagel, S. (1994). Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *171*(3), 832–838.
- Shokry, M., Omran, O. M., Hassan, H. I., Elsedfy, G. O., & Hussein, M. R. A. (2009). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human trophoblasts of normal and preeclamptic placentas: preliminary findings. *Experimental and Molecular Pathology*, *87*(3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.08.001>
- Shyu, A. B., Greenberg, M. E., & Belasco, J. G. (1989). The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes & Development*, *3*(1), 60–72.
- Sibai, B., Dekker, G., & Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet (London, England)*, *365*(9461), 785–799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17987-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17987-2)
- Sibai, B., Dekker, G., & Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet (London, England)*, *365*(9461), 785–799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17987-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17987-2)
- Sinars, C. R., Cheung-Flynn, J., Rimerman, R. A., Scammell, J. G., Smith, D. F., & Clardy, J. (2003). Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0231020100>
- Sirum-Connolly, K., & Brinckerhoff, C. E. (1991). Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1. *Nucleic Acids Research*, *19*(2), 335–341. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC333599/>
- Sluss, H. K., Barrett, T., Derijard, B., & Davis, R. J. (1994). Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(12), 8376–8384.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., & Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, *354*(6353), 494–496. <https://doi.org/10.1038/354494a0>
- Smeyne, R. J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S. J., Miao, G. G., Schilling, K., ... Morgan, J. I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*, *363*(6425), 166–169. <https://doi.org/10.1038/363166a0>
- Smith, D. F., Faber, L. E., & Toft, D. O. (1990). Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry*.
- Sng, J. C. G., Taniura, H., & Yoneda, Y. (2004). A Tale of Early Response Genes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(5), 606–612. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.606>
- Song, H., Ki, S. H., Kim, S. G., & Moon, A. (2006). Activating Transcription Factor 2 Mediates Matrix Metalloproteinase-2 Transcriptional Activation Induced by p38 in Breast Epithelial Cells. *Cancer Research*, *66*(21), 10487 LP-10496. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/21/10487.abstract>

- Spooren, A., Kooijman, R., Lintermans, B., Van Craenenbroeck, K., Vermeulen, L., Haegeman, G., & Gerlo, S. (2010). Cooperation of NFkappaB and CREB to induce synergistic IL-6 expression in astrocytes. *Cellular Signalling*, 22(5), 871–881. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.018>
- Steger, M., Murina, O., Huhn, D., Ferretti, L. P., Walser, R., Hanggi, K., ... Sartori, A. A. (2013). Prolyl isomerase PIN1 regulates DNA double-strand break repair by counteracting DNA end resection. *Molecular Cell*, 50(3), 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.023>
- Stork, P. J. S. (2002). ERK signaling: duration, duration, duration. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. <https://doi.org/10.4161/cc.1.5.145>
- Suman, P., & Gupta, S. K. (2012). Comparative analysis of the invasion-associated genes expression pattern in first trimester trophoblastic (HTR-8/SVneo) and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Placenta*, 33(10), 874–877. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.06.017>
- Sutherland, J. A., Cook, A., Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (1992). Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes & Development*, 6(9), 1810–1819.
- Tang, F.-Y., Nguyen, N., & Meydani, M. (2003). Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis in vitro through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of Akt molecule. *International Journal of Cancer*, 106(6), 871–878. <https://doi.org/10.1002/ijc.11325>
- Tanos, T., Marinissen, M. J., Leskow, F. C., Hochbaum, D., Martinetto, H., Gutkind, J. S., & Coso, O. A. (2005). Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family: Role in the AP-1 response to UV light. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500620200>
- Terasawa, K., Okazaki, K., & Nishida, E. (2003). Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes to Cells*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00631.x>
- Tom Curran, A., Miller, D., Zokas, L., & Verma, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: A comparative analysis. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90219-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90219-8)
- Toniolo, A., Buccellati, C., Pinna, C., Gaion, R. M., Sala, A., & Bolego, C. (2013). Cyclooxygenase-1 and prostacyclin production by endothelial cells in the presence of mild oxidative stress. *PLoS One*, 8(2), e56683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056683>
- Toufaily, C., Lokossou, A. G., Vargas, A., Rassart, E., & Barbeau, B. (2015). A CRE/AP-1-like motif is essential for induced syncytin-2 expression and fusion in human trophoblast-like model. *PLoS One*, 10(3), e0121468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121468>
- Tranguch, S., Cheung-Flynn, J., Daikoku, T., Prapapanich, V., Cox, M. B., Xie, H., ... Dey, S. K. (2005). Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14326–14331. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505775102>

- Ueda, Y., Hirai, S. I., Osada, S. I., Suzuki, A., Mizuno, K., & Ohno, S. (1996). Protein kinase C δ activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23512>
- Urusova, D. V., Shim, J.-H., Kim, D. J., Jung, S. K., Zykova, T. A., Carper, A., ... Dong, Z. (2011). Epigallocatechin-gallate suppresses tumorigenesis by directly targeting Pin1. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 4(9), 1366–1377. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0301>
- Valenti, D., de Bari, L., Manente, G. A., Rossi, L., Mutti, L., Moro, L., & Vacca, R. A. (2013). Negative modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by epigallocatechin-3 gallate leads to growth arrest and apoptosis in human malignant pleural mesothelioma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(12), 2085–2096.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.014>
- Van Aller, G. S., Carson, J. D., Tang, W., Peng, H., Zhao, L., Copeland, R. A., ... Luo, L. (2011). Epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, is a dual phosphoinositide-3-kinase/mTOR inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(2), 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.010>
- van Meir, C. A., Matthews, S. G., Keirse, M. J., Ramirez, M. M., Bocking, A., & Challis, J. R. (1997). 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: implications in preterm labor with and without ascending infection. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(3), 969–976. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.3.3812>
- Vandel, L., Pfarr, C. M., Huguier, S., Loiseau, L., Sergeant, A., & Castellazzi, M. (1995). Increased transforming activity of JunB and JunD by introduction of an heterologous homodimerization domain. *Oncogene*, 10(3), 495–507.
- Vatish, M., Tesfa, L., Grammatopoulos, D., Yamada, E., Bastie, C. C., & Pessin, J. E. (2012). Inhibition of akt activity and calcium channel function coordinately drive cell-cell fusion in the BeWo choriocarcinoma placental cell line. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029353>
- Vesely, P. W., Staber, P. B., Hoefler, G., & Kenner, L. (2009). Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.01.001>
- Vincent, Z. L., Mitchell, M. D., & Ponnampalam, A. P. (2015). Regulation of MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in human placenta. *Journal of Inflammation Research*. <https://doi.org/10.2147/JIR.S88039>
- Vincenti, M. P., & Brinckerhoff, C. E. (2002). Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Research*, 4(3), 157–164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC128926/>
- Vinson, C. R., Hai, T., & Boyd, S. M. (1993). Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: Prediction and rational design. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.7.6.1047>
- Vogt, P. K., & Bos, T. J. (1990). jun: oncogene and transcription factor. *Advances in Cancer Research*, 55, 1–35.

- Vouret-Craviari, V., Van Obberghen-Schilling, E., Scimeca, J. C., Van Obberghen, E., & Pouyssegur, J. (1993). Differential activation of p44mapk (ERK1) by alpha-thrombin and thrombin-receptor peptide agonist. *The Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj2890209>
- Vriz, S., Lemaitre, J. M., Leibovici, M., Thierry, N., & Méchali, M. (1992). Comparative analysis of the intracellular localization of c-Myc, c-Fos, and replicative proteins during cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.8.3548>
- Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J., & Cochran, B. H. (1990). The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *The EMBO Journal*, 9(13), 4477–4484.
- Wang, H., Xie, Z., & Scott, R. E. (1996). JunD phosphorylation, and expression of AP-1 DNA binding activity modulated by serum growth factors in quiescent murine 3T3T cells. *Oncogene*, 13(12), 2639–2647.
- Wang, J., An, F. S., Zhang, W., Gong, L., Wei, S. J., Qin, W. D., ... Zhang, M.-X. (2011). Inhibition of c-Jun N-Terminal Kinase Attenuates Low Shear Stress–Induced Atherogenesis in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Molecular Medicine*, 17(9–10), 990–999. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00073>
- Wang, L. (2011). FKBP51 regulation of AKT/Protein Kinase B Phosphorylation. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(4), 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.03.008>
- Ward, B. K., Mark, P. J., Ingram, D. M., Minchin, R. F., & Ratajczak, T. (1999). Expression of the estrogen receptor-associated immunophilins, cyclophilin 40 and FKBP52, in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 58(3), 267–280.
- Weber, J. D., Raben, D. M., Phillips, P. J., & Baldassare, J. J. (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *The Biochemical Journal*. <https://doi.org/DOI: 10.1042/bj3260061>
- Wechsler, A. S., Gordon, M. C., Dendorfer, U., & LeClair, K. P. (1994). Induction of IL-8 expression in T cells uses the CD28 costimulatory pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(6), 2515–2523.
- Whitmarsh, A. J. (2007). Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.011>
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol Rev*. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.28.16586>
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E., & Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7), 838–849. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001>
- Wochnik, G. M., Rüegg, J., Abel, G. A., Schmidt, U., Holsboer, F., & Rein, T. (2005). FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407498200>

- Wolfram, S. (2007). Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(4), 373S–388S.
- Wu, D.-M., Zhang, Y.-T., Lu, J., & Zheng, Y.-L. (2018). Effects of microRNA-129 and its target gene c-Fos on proliferation and apoptosis of hippocampal neurons in rats with epilepsy via the MAPK signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6632–6643. <https://doi.org/10.1002/jcp.26297>
- Xiao, W., Hodge, D. R., Wang, L., Yang, X., Zhang, X., & Farrar, W. L. (2004). NF-kappaB activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-AP1 site, but is independent of its IL6-NFkappaB regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells. *Cancer Biology & Therapy*, 3(10), 1007–1017.
- Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J.-U., ... Lu, K. P. (1997). Sequence-Specific and Phosphorylation-Dependent Proline Isomerization: A Potential Mitotic Regulatory Mechanism. *Science*, 278(5345), 1957–1960. <https://doi.org/10.1126/science.278.5345.1957>
- Yamazaki, T., Lee, J.-D., Shimizu, H., Uzui, H., & Ueda, T. (2004). Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 6(1), 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2003.05.002>
- Yang, C., Lim, W., Bazer, F. W., & Song, G. (2017). Myricetin suppresses invasion and promotes cell death in human placental choriocarcinoma cells through induction of oxidative stress. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.04.014>
- Yang, G. Y., Liao, J., Li, C., Chung, J., Yurkow, E. J., Ho, C. T., & Yang, C. S. (2000). Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis*, 21(11), 2035–2039.
- Yang, Z., Wolf, I. M., Chen, H., Periyasamy, S., Chen, Z., Yong, W., ... Shou, W. (2006). FK506-binding protein 52 is essential to uterine reproductive physiology controlled by the progesterone receptor A isoform. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(11), 2682–2694. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0024>
- Yao, W., Frie, M., Pan, J., Pak, K., Webster, N., Wasserman, S. I., & Ryan, A. F. (2014). C-Jun N-terminal kinase (JNK) isoforms play differing roles in otitis media. *BMC Immunology*. <https://doi.org/10.1186/s12865-014-0046-z>
- Yong, W., Yang, Z., Periyasamy, S., Chen, H., Yucel, S., Li, W., ... Shou, W. (2007). Essential role for co-chaperone Fkbp52 but not Fkbp51 in androgen receptor-mediated signaling and physiology. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609360200>
- Yuen, M.-F., Wu, P.-C., Lai, V. C.-H., Lau, J. Y.-N., & Lai, C.-L. (2001). Expression of c-Myc, c-Fos, and c-Jun in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 91(1), 106–112. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010101\)91:1<106::AID-CNCR14>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010101)91:1<106::AID-CNCR14>3.0.CO;2-2)

- Zhang, X., Zhang, L., Yang, H., Huang, X., Otu, H., Libermann, T. A., ... Olumi, A. F. (2007). c-Fos as a Proapoptotic Agent in TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 67(19), 9425–9434. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1310>
- Zhao, M., Li, L., Yang, X., Cui, J., & Li, H. (2017). FN1, FOS, and ITGA5 induce preeclampsia: Abnormal expression and methylation. *Hypertension in Pregnancy*, 36(4), 302–309. <https://doi.org/10.1080/10641955.2017.1385795>
- Zhou, Y., Damsky, C. H., & Fisher, S. J. (1997). Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *The Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2152–2164. <https://doi.org/10.1172/JCI119388>
- Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., & Damsky, C. H. (1997). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *The Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2139–2151. <https://doi.org/10.1172/JCI119387>
- Zhou, Y., McMaster, M., Woo, K., Janatpour, M., Perry, J., Karpanen, T., ... Fisher, S. J. (2002). Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *The American Journal of Pathology*, 160(4), 1405–1423. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62567-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62567-9)