



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES
DEL RECEPTOR NUCLEAR NUR77 EN LA
MODULACIÓN DEL DESTINO CELULAR:
PROLIFERACIÓN O MUERTE”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

XICOTENCATL GRACIDA CANALES

TUTOR:

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Por todo y sobre todo,
a mis padres.

Agradecimientos

Agradezco mucho el apoyo del M. en C. Andrés Saralegui Amaro de la Unidad de Microscopía Confocal y de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. También agradezco a Alicia Dione Guemez y al Dr. Julio Morán Andrade por la donación del siRNA fluorescente.

Finalmente, quiero destacar que este trabajo es el resultado de la dirección, supervisión y análisis conjunto de la Dra. Susana Castro Obregón y el Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles, además de los valiosos comentarios del Dr. Ramón González García-Conde.

Este trabajo fue financiado por los proyectos PAPIIT **IN-2022005** y CONACyT **PQ 46174**.

I. INTRODUCCIÓN.....	10
1. La muerte celular programada; definición e implicaciones.....	10
2. Muerte celular programada tipo I o apoptosis.....	13
2.1 Morfología de la célula apoptótica	13
2.2 Cambios a nivel bioquímico.....	13
2.3 Componentes moleculares de la muerte apoptótica.....	13
2.4 Activación de la apoptosis.....	14
2.4.1 Vía extrínseca de la apoptosis.....	15
2.4.2 Vía intrínseca de la apoptosis.....	16
2.5 Regulación de la vía intrínseca de la apoptosis.....	17
2.5.1 La familia de proteínas Bcl2.....	17
2.6 Apoptosis dependiente de p53.....	20
3. Muerte celular programada tipo 2 o autofagia.....	21
3.1 Características de la autofagia.....	22
3.2 Mecanismos genéticos y moleculares que regulan la autofagia.....	22
3.2.1 Sistemas de conjugación Atg12, Atg8.....	23
3.2.2 La ruta de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K)	24
3.3 Participación de la autofagia en patologías.....	25
4. Muerte celular programada tipo 3 o citoplásmica.....	26
II. ANTECEDENTES.....	27
1. Un modelo alternativo de muerte celular programada no apoptótica.....	27
1.1 La cinasa ERK2.....	29
1.2 Nur77: un mediador clave en la muerte celular programada no apoptótica.....	30
2. La familia de receptores nucleares Nur77.....	30
2.1 Características estructurales de Nur77.....	30
2.2 Expresión de Nur77 y su regulación.....	31
2.3 Regulación transcripcional por Nur77.....	32

2.4 Regulación pos-traducciona de Nur77.....	33
2.4.1 Fosforilaciones que afectan la función de Nur77.....	33
2.5 Influencia de la distribución subcelular de Nur77 sobre su función.....	34
2.5.1 Mecanismos reguladores de la exportación de Nur77.	34
3. Modelos de función de Nur77 en la modulación de procesos biológicos.....	35
3.1 Inducción de la progresión del ciclo celular y proliferación.....	35
3.2 Inducción de apoptosis por translocación a la mitocondria.....	36
3.3 Selección negativa de timocitos dependiente de la actividad transcripcional de Nur77...37	
3.4 Nuevos paradigmas de función de Nur77	38
III. JUSTIFICACIÓN.....	40
IV. HIPÓTESIS.....	42
V. OBJETIVOS.....	42
1. Objetivos particulares.....	42
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
I. Estrategia experimental.....	43
1. Microbiología.....	44
1.1 Transformación de bacterias quimiocompetentes mediante el método de CaCl ₂	44
1.2 Almacenamiento de bacterias en glicerol.....	45
1.3 Purificación de plásmidos.....	45
2. Cultivo celular.....	48
2.1 Cultivo de células HEK 293.....	50
2.2 Transfección transitoria de células HEK293T.....	51
2.2.1 Transfección de siRNA.....	53
2.3 Inducción de muerte con SP.....	54
2.4 Conteo de células muertas.....	54

2.5 Descongelación y expansión de células HEK 293.....	54
2.5.1 Congelación de células HEK 293.....	55
3. Inmunocitoquímica y tinción de organelos.....	56
3.1 Inmunocitoquímica.....	57
3.2 Tinción de mitocondrias y aparato de Golgi.....	58
4. Biología Molecular.....	59
4.1 Digestión de plásmidos para linearización.	60
4.2. Mutagénesis sitio dirigida.....	61
4.2.1 Concentración del producto de PCR tratado con DpnI.....	62
4.2.2 Transformación de las bacterias ultra competentes.....	63
4.3 Secuenciación de las construcciones.....	63
5. <i>Western Blot</i>	64
5.1 Lisis de células y extracción de proteínas.....	66
5.2 Determinación de la concentración de proteínas.....	67
5.3 SDS-PAGE electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes.....	68
5.3.1 Desnaturalización de las proteínas.....	68
5.3 Transferencia húmeda de proteína de un gel de acrilamida a membrana PVDF.....	69
5.5 Revelado.....	71
6. Interferencia de RNA.....	71
6.1 Diseño de oligonucleótidos.....	71
6.2 Cuantificación de siRNA.....	75
7. Análisis en microscopía confocal y procesamiento de imágenes.....	75
VII. RESULTADOS	76
1. Obtención de plásmidos.....	76
2. Estandarización de las condiciones de transfección de la línea HEK293.....	77
3. Reproducción del modelo de muerte celular programada no apoptótica.....	77
4. Evaluación de la localización nuclear vs. citoplásmica de Nur77::GFP.....	79

5. Nur77::GFP no co-localiza con las mitocondrias ni con el complejo de Golgi.....	81
6. Nur77 endógeno tiene una localización principalmente nuclear durante la MCP inducida por NK ₁ R/SP.....	84
7. Nur77 no co-localiza con las mitocondrias, el retículo endoplásmico ni con los endosomas	87
8. Síntesis de dos siRNA contra Nur77 y estandarización de las condiciones de transfección del siRNA.	89
IX. DISCUSIÓN.....	91
1. Análisis de la MCP inducida por SP/NK ₁ R.....	91
2. Efecto protector de la muerte celular por la sobreexpresión de Nur77.....	92
3. Análisis de la distribución nuclear vs. citoplásmica de Nur77::GFP.....	93
4. Distribución subcelular de Nur77 endógeno.....	94
5. Translocación de Nur77 del núcleo a las mitocondrias o al retículo endoplásmico.....	95
6. Translocación de Nur77 del núcleo a los endosomas.....	95
7. Localización de ERK2 y la potencial fosforilación de Nur77.....	96
8. Relevancia funcional de la porción de Nur77 citoplásmico.....	96
9. Aparato de Golgi y lisosomas, dos organelos implicados en autofagia.....	96
10. Posible influencia del ciclo celular en la respuesta a SP o al efecto de Nur77.....	97
11. Evidencia de la función nuclear de Nur77.....	99
12. Activación transcripcional de Nur77 relacionada con gluconeogénesis, ¿la conexión con autofagia?	100
X. CONCLUSIONES.....	101
XI. PERSPECTIVAS.....	102
XI. REFERENCIAS	104

I. INTRODUCCIÓN

1. La muerte celular programada; definición e implicaciones.

La muerte celular que ocurre durante el desarrollo es un proceso reproducible espacial y temporalmente, por lo tanto, se le denomina: muerte celular programada (MCP). En la MCP la célula juega un papel activo en su propia destrucción al utilizar un conjunto de mecanismos moleculares que están implicados en la regulación y ejecución del proceso de muerte celular; es decir, tanto el destino de la célula a morir como el curso de la muerte celular están programados (Goldstein *et al.* 1991). La MCP es un proceso normal y esencial del desarrollo de los eucariontes pluricelulares, su activación está regulada por señales extracelulares y ocurre en células potencialmente funcionales¹. De hecho, la MCP es una posible respuesta o destino celular que puede tomar una célula, tal como la diferenciación o la proliferación; y de manera general, la ausencia o presencia de una señal extracelular desencadena la muerte celular, poniendo de manifiesto su importancia funcional en un entorno pluricelular al igual que la diferenciación y la proliferación (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

La MCP es un proceso que participa en diversos fenómenos que son necesarios para culminar el desarrollo de un organismo. Por ejemplo, ocurre MCP durante la maduración del sistema nervioso de los vertebrados donde aproximadamente el 50% de las neuronas son eliminadas; también participa en la ontogenia durante la degeneración de estructuras evolutivamente conservadas, en la degeneración de estructuras asociadas al dimorfismo sexual, así como también en la degeneración y remodelación de tejidos para dar origen a algunos órganos, como los dígitos en las manos. Por otro lado, en los adultos, en respuesta a ciertos factores ambientales, ocurre muerte celular que no es reproducible con exactitud espacio-temporal como en el desarrollo; sin embargo, el tipo de muerte celular que ocurre en ambos casos presenta similitudes en sus mecanismos. Por lo tanto, a este tipo de muerte que ocurre en el adulto también se le considera MCP. Por ejemplo, el recambio de epitelios y de otros tipos celulares, el control de la masa celular de algunos órganos como el hígado, el funcionamiento óptimo del sistema inmune, el control de la vida media de las plaquetas, la neurodegeneración, entre otros, dependen todos en mayor o menor grado de MCP (Mason *et al.* 2007, revisado en Chowdrury *et al.* 2006 y en Castro Obregón *et al.* 2003).

¹ Especialmente durante el desarrollo.

Por lo tanto, el control de la muerte celular es fundamental tanto en el desarrollo como en el adulto, de tal modo que un déficit o exceso en el número de células que *deben* morir puede predisponer a ciertas patologías (Ameisen JC 2002). Por otra parte, se creía que la MCN, en contraste a la MCP, ocurría solamente como resultado de daños fisicoquímicos agudos (como la pérdida del balance osmótico o anoxia abrupta) y que procedía de manera desordenada, por lo cual se refería a un tipo de muerte pasivo. Sin embargo, estudios más recientes apuntan que la muerte celular de tipo necrótico puede ocurrir como el resultado de un entrecruzamiento de varias rutas de señalización, como: Fas/TNF-R1/TRAIL-R, ceramidas, rutas mediadas por calcio y especies reactivas de oxígeno (Revisado en Huettenbrenner *et al.* 2003 y Ameisen JC 2002). La muerte celular necrótica (MCN) se caracteriza por un aumento en el volumen celular, daño irreversible en la membrana plasmática, rompimiento de organelos, degradación al azar del DNA y liberación de citocinas pro-inflamatorias. A pesar de que hasta la fecha no existen marcadores específicos de la necrosis y de que es difícil distinguir entre las fases de iniciación, propagación y ejecución de ésta, la cinasa serín-treonín RIP1 parecería ser una proteína central iniciadora de la MCN (Revisado en Festjens *et al.* 2006). Por otra parte, tanto calpaínas² y catepsinas³ han sido implicadas en la muerte necrótica bajo una hipótesis que sugiere que los estímulos necróticos causan un aumento excesivo en los niveles de Ca⁺⁺, lo cual a su vez lleva a la ruptura de los lisosomas mediada por calpaína y consecutivamente ocurre la liberación de catepsinas B y L (Revisado en Syntichaki *et al.* 2002 y Festjens *et al.* 2006).

A nivel evolutivo, la MCP es de crucial importancia y se ha especulado que el surgimiento de mecanismos reguladores de la muerte celular precedieron el surgimiento de pluricelularidad (Revisado en Huttenbrenner *et al.* 2003). Esto tiene cierto sustento ya que el surgimiento de mecanismos del control de la muerte celular parece haber ocurrido desde etapas tempranas en la evolución de los eucariontes. En concordancia, el protista *Dictyostelium sp.*, que tiene una posición filogenética basal entre los eucariontes, presenta durante su desarrollo un tipo de muerte celular programada independiente de caspasas y se observa vacuolización masiva, condensación citoplásmica y condensación focal de cromatina; características que sugieren un tipo de MCP diferente a la apoptótica (Cornillon *et al.* 1994 y Lam *et al.* 2005).

² Cisteín proteasas citosólicas que sensan Ca²⁺ intracelular y median la ruptura de lisosomas.

³ Enzimas lisosomales hidrolíticas.

Por consiguiente, la presencia de un mecanismo de MCP en un organismo con una posición filogenética basal podría sugerir que en la evolución de los eucariontes, la MCP apareció sólo una vez como un mecanismo general de muerte y que con el paso del tiempo se añadieron niveles de complejidad al proceso inicial y que éste mecanismo se ha ajustado en función del organismo y/o en función de constricciones mecánicas o de la maquinaria enzimática del tipo celular (Revisado en Lam *et al.* 2005).

Por otra parte, de acuerdo a características bioquímicas y morfológicas la MCP que ocurre durante el desarrollo se ha dividido en tres tipos: tipo 1 o **apoptosis**, tipo 2 o **autofágica** y tipo 3 o **citoplásmica** (Clarke P.G 1990). Sin embargo, cabe mencionar que hay autores que proponen que solamente existe un programa de muerte celular programada: la apoptosis; y engloban a la muerte vesicular (tipo 2 o tipo 3) como muerte necrótica.

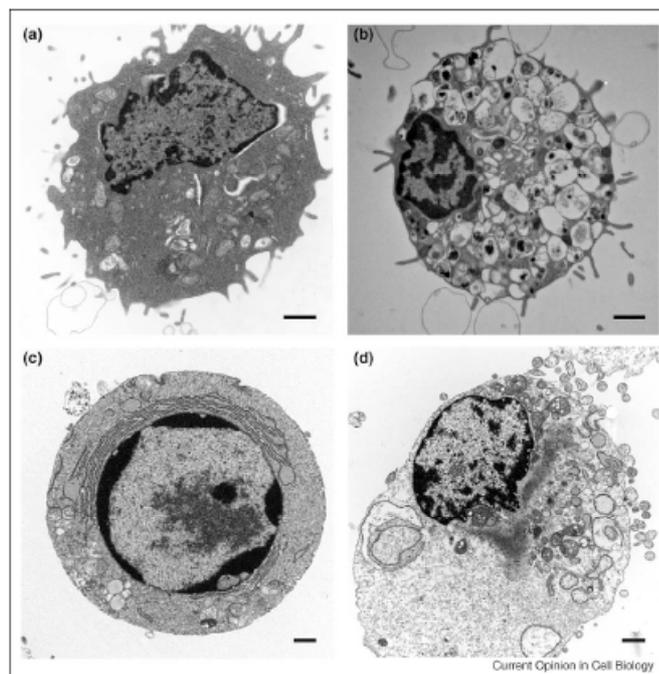


Figura 1. Características morfológicas de diversos tipos de muerte celular. a) Célula normal. b) Célula autofágica; se observa gran cantidad de vesículas en el citoplasma c) Célula apoptótica; se observa la cromatina condensada y el retículo endoplásmico dilatado alrededor del núcleo. d) Célula necrótica; se observa la ruptura de la membrana plasmática y la formación de vesículas en el citoplasma debido a la catástrofe bioenergética que induce la autofagia (Tomado de Edinger *et al.* 2004, la barra representa 1 μm)

2. Muerte celular programada tipo I ó apoptosis.

El término *apoptosis* inicialmente correspondió a la descripción morfológica de una forma de muerte celular que era diferente a la necrosis (Kerr *et al.*, 1972). A partir de estudios bioquímicos y de análisis genéticos en *C. elegans* se identificaron los mecanismos moleculares y los marcadores morfológicos que actualmente la definen. Los genes involucrados en el desarrollo de la apoptosis están ordenados en una ruta genética dividida en cuatro eventos celulares: 1) la “decisión” de la célula a morir, 2) la ejecución, 3) el engullimiento por parte de células vecinas y 4) la degradación de los cuerpos apoptóticos (Revisado en Lettre *et al.* 2006).

2.1 Morfología de la célula apoptótica

Las primeras alteraciones morfológicas que se observan en la apoptosis ocurren en la membrana plasmática; por ejemplo, se pierden los contactos célula-célula y las estructuras especializadas de membrana. Por otra parte, la célula apoptótica pierde tonicidad; a nivel nuclear, se observa la condensación de la cromatina y luego se fragmenta el núcleo como resultado del desensamblaje de la lámina nuclear. A nivel citoplásmico, el retículo endoplásmico (RE) se dilata y forma vesículas que se funden con la membrana plasmática para formar protuberancias que eventualmente se desprenden generando los cuerpos apoptóticos (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

2.2 Cambios a nivel bioquímico

Por su parte, a nivel bioquímico ocurre la activación de diversas enzimas; por ejemplo: las caspasas, cistein-aspartil proteasas que juegan un papel crucial en la regulación de la apoptosis. También, se activan las DNAsas I y II, endonucleasas que degradan al DNA en fragmentos mayores de 50 kb y eventualmente en multímeros de nucleosomas. Por otro lado, se activa la transglutaminasa y específicamente se degrada una enzima que participa en la reparación del DNA: la poli(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP). Además, aumenta la actividad de la flipasa, una enzima que cataliza la translocación de fosfatidilserina desde el lado citoplásmico hacia la capa externa de la membrana plasmática (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

2.3 Componentes moleculares de la muerte apoptótica

Como anteriormente se mencionó, las caspasas son proteasas específicas que tienen un residuo de cisteína en su sitio activo y cortan sus sustratos después de residuos de ácido

aspártico. Estas enzimas existen en forma de zimógenos y algunas de ellas se activan por autocatálisis cuando se inicia la apoptosis. La estructura general de las caspasas se caracteriza por la presencia de un pro-dominio N-terminal grande o pequeño que generalmente determina su función como “caspasa iniciadora” (dominio grande) o “caspasa efectora” (dominio pequeño). En este mismo pro-dominio se encuentran dos motivos: el “dominio efector de muerte” (DED, por sus siglas en inglés) o el “dominio de reclutamiento de caspasas” (CARD, por sus siglas en inglés). La importancia de las caspasas como componente clave de la MCP, en especial de la apoptosis, radica en que se expresan ampliamente en diversos tejidos y etapas del desarrollo, además de que inhibidores de caspasas bloquean la apoptosis durante el desarrollo y se sabe que diversas caspasas como la: -2, -8, -9, -10 y -12 la regulan, mientras que las caspasas -3, -6 y -7 ejecutan la apoptosis (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

Los mecanismos de ejecución de muerte mediada por caspasas radican en el procesamiento o activación proteolítica de componentes clave del núcleo, citoesqueleto o rutas específicas de transducción de señales. De manera general, el efecto de las caspasas puede: inactivar componentes que promueven sobrevivencia o procesar moléculas que promueven apoptosis. Por ejemplo, por procesamiento proteolítico se producen cinasas hiperactivas que activan proteínas activadas por estrés, y estas últimas inducen apoptosis por mecanismos dependientes de ellas. Otro ejemplo de funcionamiento de caspasas es la proteólisis de proteínas asociadas a citoesqueleto que participan en la formación de adhesiones focales⁴, esto conlleva a la pérdida de las señales de sobrevivencia. Otro mecanismo de función es la destrucción de proteínas que participan en el monitoreo del daño genómico o que regulan el ciclo celular como las proteínas supresoras tumorales p53 y Rb; o el desensamblaje del núcleo por proteólisis de proteínas de membrana nuclear o por activación proteolítica de la nucleasa que degrada al DNA (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

2.4 Activación de la apoptosis.

En las células apoptóticas de mamíferos existen dos distintos mecanismos o rutas que son activadas dependiendo de los estímulos del ambiente intra o extracelular. Los estímulos extracelulares de muerte inducen una ruta (la vía externa) mediada por receptores de superficie mientras que los estímulos intracelulares y la alteración de la integridad

⁴ Estructura lípido-proteica estabilizada por GTP-Rho que permite a las células unir la matriz extracelular con la red intracelular de actina y modular la respuesta a factores de crecimiento, entre otras funciones.

mitocondrial disparan una ruta de señalización mediada por la mitocondria (vía intrínseca); por ejemplo, el caso de la proteína p53 que incide en la vía intrínseca. Además, existen otras rutas de señalización de apoptosis como la ruta dependiente del retículo endoplásmico (Revisado en Chowdhury *et al.* 2006).

2.4.1 Vía extrínseca de la apoptosis.

En la vía extrínseca, un grupo de “receptores de muerte” al ser activados por sus ligandos o anticuerpos agonistas inducen apoptosis. Estos receptores se caracterizan por la presencia de un “dominio de muerte”, que media la oligomerización de los mismos receptores, y que es necesario para inducir la muerte. Ejemplo de estos receptores y sus ligandos⁵ son: TNF-R1/CD120a y TNF α ; Fas/CD95 y ligando de Fas (FasL/CD95L/CD178); TRAIL-R1, R2/DR4, DR5 y TRAIL/Apo-2L, respectivamente. Después de que el receptor es activado por su ligando ocurre la trimerización⁶ del receptor y hacia el lado citoplásmico ocurre el reclutamiento de proteínas adaptadoras como FADD o TRADD las cuales a su vez pueden: 1) reclutar otras proteínas que contienen dominios de muerte como RIP-1; o 2) reclutar caspasas iniciadoras como las procaspasas 8 y 10, cuyas formas activas procesan a los zimógenos de las caspasas efectoras: procaspasas -3, -6, -7 (**Figura 2**).

La apoptosis mediada por receptores de muerte puede ser regulada por ciertos mecanismos; uno de estos consiste en evitar la unión de procaspasas a las proteínas adaptadoras del complejo activado⁷. Otro mecanismo de regulación consiste en expresar receptores que interactúan con los ligandos de muerte pero que carecen del dominio citoplásmico o éste está truncado y por lo tanto no pueden formar el complejo activado. Por ejemplo, estos receptores truncados: DcR1, DcR2 y DcR3 asemejan a DR4 y DR5. (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003). Por otro lado, la apoptosis mediada por vía extrínseca también puede ser regulada por proteínas que bloquean la activación e inhiben la actividad de procaspasas.

⁵ La mayoría de estos ligandos pertenecen a la superfamilia de TNF pero no así FasL.

⁶ Datos indican que Fas está como trímero aún sin FasL.

⁷ Por ejemplo, c-FLIP compete con la unión de procaspasas a FADD y tiene un efecto inhibitorio en la muerte.

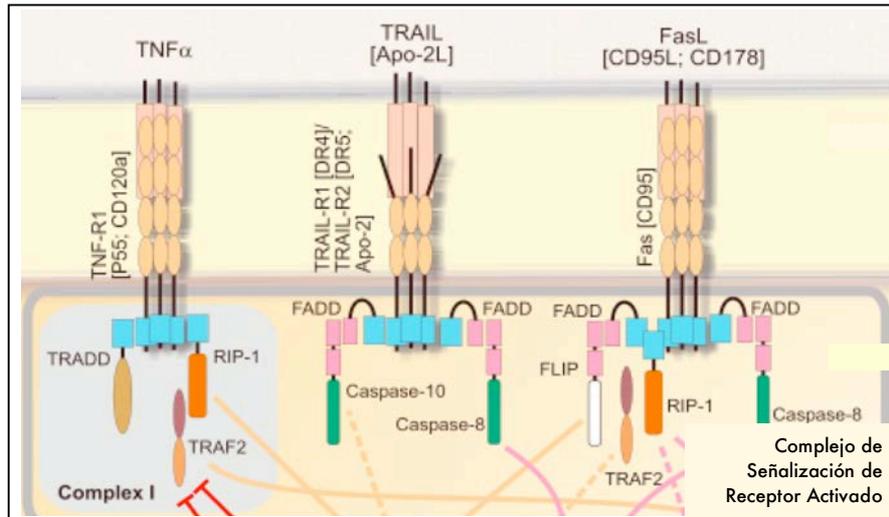


Figura 2. Algunos receptores de muerte, sus ligandos y proteínas adaptadoras. (Imagen modificada de *Alexis Biochemicals Wallcharts*.)

2.4.2 Vía intrínseca de la apoptosis.

La activación de las caspasas es un punto crucial para la progresión de la muerte apoptótica. Como anteriormente se describió, una manera de activar las caspasas es mediante la acción de proteínas adaptadoras. Por otra parte, varios estímulos apoptóticos activan caspasas efectoras a través de la vía mitocondrial o vía intrínseca donde la procaspasa-9 es la principal caspasa iniciadora. (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

El citocromo *c* es un componente de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria; en respuesta a una variedad de estímulos apoptóticos como: agentes que inducen daño al DNA, inhibidores de cinasas, entre otros, se induce su translocación al citoplasma. Ahí, el citocromo *c* interactúa con Apaf-1 y la procaspasa-9 para formar el “apoptosoma”, un complejo multimérico grande (~700-1400 kDA) necesario para la activación de la procaspasa-9 (**Figura 3**). Una vez activada ésta se libera del apoptosoma, recluta y activa caspasas efectoras como la -3, -6 y -7. La formación y función del apoptosoma puede ser regulado por niveles de K^+ intracelular, las proteínas IAP y Smac/Diablo (Cain *et al.* 2001). Apaf-1 es una proteína citosólica que se activa con la unión del citocromo *c*, hacia el lado amino-terminal tiene un dominio CARD que le permite interactuar con la procaspasa-9 mientras que hacia el lado carboxilo terminal tiene un dominio WD40 que une el citocromo *c* y regula su interacción con la procaspasa-9 (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

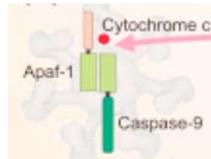


Figura 3. El apoptosoma. En presencia de citocromo *c* y dATP, Apaf-1 se oligomeriza para formar un complejo multimérico que recluta y procesa a la caspasa-9 para formar un complejo de holoenzima. (Imagen modificada de *Alexis Biochemicals Wallcharts*)

2.5 Regulación de la vía intrínseca de la apoptosis

Varias proteínas antiapoptóticas regulan de manera negativa la activación de caspasas por la vía mitocondrial. Por ejemplo, en mamíferos, cinco genes codifican para las proteínas inhibitorias de apoptosis (IAP). Hacia el lado amino-terminal, estas proteínas contienen copias de un dominio BIR⁸ que le permite interactuar con caspasas activas como -3, -7 y -9 e inhibir su actividad. Por otro lado, hacia el dominio carboxilo terminal las IAP's tienen un *dedo de zinc* que funciona como una ligasa de ubiquitina con lo cual promueve la degradación por proteosoma de una forma de IAP, XIap y de su caspasa asociada (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

Por otro lado, otras proteínas regulan la apoptosis de manera positiva, tal es el caso de Smac/diablo que se libera de la mitocondria junto con el citocromo *c*. Smac/diablo se asocia a las IAP previniendo la función de esta última y por lo tanto tiene un efecto proapoptótico. Resulta interesante el nivel de regulación redundante que coordinadamente logran proteínas apoptóticas con antiapoptóticas. Por ejemplo, en respuesta a estímulos apoptóticos se libera el citocromo *c* junto con Smac/diablo; el citocromo *c* activa a Apaf-1 y las IAP inactivan a la procaspasa-9 pero esta inhibición se mantiene hasta que Smac/diablo se asocia con las IAP, entonces se libera la procaspasa-9 y forma el complejo del apoptosoma (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003 y en Cain *et al.* 2002).

2.5.1 La familia de proteínas Bcl2

Los miembros de la familia⁹ de proteínas Bcl-2 controlan la permeabilización de la membrana mitocondrial y regulan la iniciación de la activación de caspasas al regular la formación del apoptosoma. Como más adelante se detallará, la función de los miembros de la familia Bcl-2 como proteínas proapoptóticas o antiapoptóticas está determinada por la

⁸ *Baculovirus IAP repeat*

⁹ Esta familia está conservada en el reino animal y regula la muerte celular tanto en nemátodos y artrópodos como en mamíferos.

presencia de específica de dominios de homología a Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4). De manera general, los miembros antiapoptóticos protegen de muerte al bloquear en la mitocondria la liberación de moléculas apoptogénicas. En contraste, en respuesta al daño celular los miembros proapoptóticos se translocan a organelos como la mitocondria o el retículo endoplásmico y ahí interactúan con miembros antiapoptóticos bloqueando así el efecto protector de los últimos y predispone así a las células a morir (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

La familia Bcl-2 está dividida en tres subfamilias: una antiapoptótica Bcl-2 y dos proapoptóticas Bax y BH3. Los miembros de la subfamilia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X, A1, Boo, Bcl-w, Mcl-1) tienen los cuatro dominios de homología BH1-4 pero los distingue la presencia del dominio BH4 que tiene un efecto antiapoptótico. Por su parte, la subfamilia Bax (Bax, Bak y Bok) presenta los dominios BH1-3 pero carece del dominio BH4, mientras que la subfamilia de BH3 (Bim, Bik, Bad, Bid, Harakiri, Noxa) solamente contiene el dominio BH3 que es indispensable para su función proapoptótica (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003).

Los dominios de homología BH1-4 además de especificar una identidad anti o proapoptótica son necesarios para la interacción entre los distintos miembros de la familia Bcl-2 y otras proteínas. Los dominios BH1 y BH2 son necesarios para la mayoría de interacciones y confieren especificidad de interacción entre miembros apoptóticos con antiapoptóticos. Por ejemplo, los miembros BH3 no homodimerizan y por lo tanto pueden formar heterodímeros con miembros antiapoptóticos de la subfamilia Bcl-2 promoviendo así una neutralización del efecto protector de los últimos. Por lo anterior, la muerte o sobrevivencia de una célula depende de un balance entre las acciones antagónicas de los miembros de la familia Bcl-2 y de otras proteínas no relacionadas que pueden interactuar con los miembros Bcl-2. Por ejemplo, R-Ras¹⁰ inhibe la capacidad de Bcl-2 de proteger de muerte apoptótica y en este caso permite establecer una conexión entre señales extracelulares y la maquinaria de muerte. Por otra parte, se ha propuesto que la proteólisis pudiera ser un mecanismo de regulación de miembros Bcl-2 (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003). También existe evidencia de que algunos miembros Bcl-2 podrían estar regulados por cambios conformacionales inducidos por interacciones directas con otras proteínas como el receptor nuclear Nur77 (Lin *et al.* 2004, Luciano *et al.* 2007).

¹⁰ Es una oncoproteína transductora de señales mitogénicas y de diferenciación.

En el caso de mamíferos adultos, Bcl-2 se expresa en tejidos con tiempos largos de sobrevivencia. Por otra parte, los miembros de la subfamilia BH3 tienen una especificidad de activación bajo circunstancias y tejidos específicos. Estos son potentes inductores de muerte y su actividad está regulada tanto a nivel transcripcional como postraduccional; en el primer caso, la transcripción de la *hrk* o *noxa* se induce en respuesta a estímulos apoptóticos. Por otra parte, la regulación postraduccional puede ocurrir por proteólisis, como en el caso de Bid, o por fosforilación como en el caso de Bad (Revisado en Castro Obregón *et al.* 2003). Casi todos los miembros de las subfamilias Bcl-2 y Bax tienen en el extremo carboxilo un dominio hidrofóbico que les permite anclarse en dominios a membranas del retículo endoplásmico, nuclear y a la membrana externa de la mitocondria. La función anti-apoptótica de Bcl-2 está favorecida por su presencia en la membrana mitocondrial más que en las otras, aunque en algunos casos su localización en el retículo endoplásmico es suficiente para proteger de muerte. Los mecanismos por los cuales la familia Bcl-2 protege o induce muerte son controversiales, pero están relacionados con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Kroemer *et al.* 2007).

En condiciones normales, la proteína Bax tiene una localización citoplásmica; sin embargo, cuando se induce apoptosis Bax se inserta en la membrana externa de la mitocondria donde se cree que forma homo-oligómeros de Bax o hetero-oligómeros con otras proteínas proapoptóticas como Bak o tBid; estos agregados forman discontinuidades transitorias en la membrana y desestabilizan la bicapa lipídica. Otros reportes sugieren que la desestabilización de la membrana lipídica se debe a un efecto *per se* de Bax o Bak más que a la formación de poros específicos. Sin embargo, de acuerdo a otros reportes, Bax interactúa con proteínas del complejo del poro de permeabilidad transitoria (PTPC) como ANT y/o VDAC para inducir permeabilidad en la membrana mitocondrial. Así, cual sea el mecanismo por el cual Bax o Bak actúan (independiente del PTPC o en coordinación con éste) eventualmente, ambas rutas llevan a la permeabilización de ambas membranas mitocondriales y a liberación de proteínas proapoptóticas desde el espacio intermembranal (Kroemer *et al.* 2007).

Por otra parte, la manera en que los miembros Bcl-2 antiapoptóticos protegen es también un tema controversial. De acuerdo a algunos reportes, estos miembros actúan como “simples” inhibidores de proteínas con dominio BH3, o su interacción con otros miembros

Bcl-2 previene la formación de “poros Bax / Bak” y de poros del PTPC como VDAC y ANT que inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial (Kroemer *et al.* 2007).

2.6 Apoptosis dependiente de p53

p53 es una proteína supresora de tumores con funciones apoptóticas y anti-proliferativas complejas que median su actividad antineoplásica. p53 se acumula en el citoplasma durante la fase G1 del ciclo celular y migra al núcleo al inicio de la fase S. p53 puede funcionar como factor de transcripción en respuesta al daño al DNA. En este caso, p53 induce la transcripción de genes que detienen la progresión del ciclo celular; por ejemplo, *p21 CIP/WAF1*¹¹. Sin embargo, cuando el daño al DNA sobrepasa la capacidad de la maquinaria de reparación, p53 favorece la transcripción de genes proapoptóticos como *Puma*, *Noxa*, *Bax*, *Bid*, *Fas*, *p53AIP*, entre muchos otros pero además media la trans-represión de *Bcl-2* y *survivina*, y entonces la célula se predispone a apoptosis. En ambos casos, la función de transactivación y de unión a proteínas mitocondriales (que se describen más adelante) son mediadas por su dominio de unión a DNA (Revisado en Moll *et al.* 2006 y en Castro Obregón *et al.* 2003).

A pesar de que p53 carece de secuencias de localización mitocondrial, varias señales de muerte, pero no modificaciones postraduccionales como fosforilación o acetilación inducen su translocación a la membrana externa de la mitocondria donde su presencia *per se* es suficiente para inducir apoptosis, debido a su capacidad de permeabilizar por sí sola a la membrana mitocondrial externa e inducir la liberación de moléculas pro-apoptóticas como: citocromo *c*, Smac/Diablo, endonucleasa G y AIF desde el espacio intermembranal. Por otra parte, p53 media la muerte celular a través de tres mecanismos mitocondriales interrelacionados. Por un lado, p53 se une directamente a BclXL y Bcl2 mitocondriales con lo que se libera a Bak y Bax antagonizando el efecto anti apoptótico de los primeros. Por otro lado, p53 libera a Bak de Mcl-1¹² al formar complejos p53/Bak que promueven la homooligomerización y activación de Bak. Finalmente, p53 puede unirse a BclXL citosólico y liberar a Bax. A pesar de ser diferentes en los detalles, los tres mecanismos antes descritos comparten la interacción física con proteínas BH3 que directamente permeabilizan la membrana mitocondrial externa (Revisado en Moll *et al.* 2006).

¹¹ *CIP1/WAF1* es un inhibidor de las CDKs, quienes promueven la progresión del ciclo celular

¹² Mcl-1 tiene una vida media corta y sus niveles de expresión están altamente regulados, se induce rápidamente por señales de sobrevivencia pero también se degrada rápidamente durante la apoptosis.

Para los fines de este trabajo, resulta interesante p53, ya que comparte características con el receptor nuclear Nur77, pues son dos factores de transcripción que pueden mediar programas de muerte independientemente de su actividad transcripcional y presentan importantes similitudes en sus mecanismos de función. Más adelante se detallará un mecanismo de interacción entre Nur77 y p53 recientemente elucidado.

3. Muerte celular programada tipo 2 o Autofagia

La autofagia es un proceso filogenéticamente antiguo y conservado en las células eucariontes¹³ que mantiene funciones homeostáticas como el recambio de proteínas y organelos mediante su degradación dentro de los lisosomas. La autofagia se puede inducir rápidamente bajo condiciones que provocan estrés celular como la privación de nutrientes o factores de crecimiento. Tanto en levaduras como en mamíferos la autofagia puede activarse por la disminución de nutrientes esenciales e inanición. Debido a que los sustratos que se degradan durante la autofagia se disocian completamente en sus partes constituyentes, la autofagia funciona como una fuente de bloques estructurales (aminoácidos, componentes de organelos; etc.) y sustratos para la generación de energía que permitan continuar la sobrevivencia celular. (Revisado en Gozuacik *et al.* 2007 y Ohsumi 2001).

Los sustratos que se degradan durante la autofagia pueden llegar al lumen lisosomal por tres diferentes vías, denominadas: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La diferencia entre macroautofagia y microautofagia radica en el origen de la membrana que aísla el material citosólico; en la macroautofagia la membrana no es de origen lisosomal, sino que se forma una estructura membranal llamada pre-autofagosoma que después se elonga para formar una membrana de aislamiento y finalmente una estructura de doble membrana, el autofagosoma que engloba a los sustratos a degradación, y finalmente se fusiona con los lisosomas. En la microautofagia es de origen lisosomal. Es decir, en la microautofagia la misma membrana lisosomal se deforma y engloba los sustratos citosólicos. En la autofagia mediada por chaperonas, varias proteínas que contienen una secuencia consenso KFERQ¹⁴ pueden ser transportadas por una chaperona citosólica hacia un receptor en la membrana lisosomal que media su translocación al lumen del lisosoma donde una segunda chaperona media la translocación del sustrato. Hasta el momento, no hay evidencia que la autofagia mediada por chaperonas ocurra en mamíferos. (Revisado en Cuervo 2004).

¹³ En amebas, levaduras y hasta en mamíferos se pueden encontrar genes ortólogos de autofagia.

¹⁴ Lisina, fenilalanina, glutamato, arginina, glutamina

Los mecanismos descritos de aquí en adelante referidos como autofagia se referirán a la macroautofagia, ya que es el único mecanismo asociado a la MCP. Por otra parte, los mecanismos autofágicos están implicados en ciertos procesos fisiológicos como la diferenciación celular, la remodelación de tejidos, la degeneración de órganos o estructuras (*i.e.* metamorfosis), el control de crecimiento y la defensa celular. En síntesis, las funciones de la autofagia están implicadas en la adaptación a condiciones adversas así como en procesos dinámicos del desarrollo (Revisado en Ohsumi 2001, Cuervo 2004 y Mizushima 2005). En contraste, existe evidencia de que la maquinaria autofágica puede ser reclutada para matar células y mediar una forma de muerte celular programada alternativa a la apoptosis y que bajo ciertas condiciones es independiente de caspasas (Revisado en Gozuacik *et al.* 2007). Resulta controversial catalogar a la autofagia como un modelo de MCP debido a que a pesar de ser un mecanismo de supervivencia y de protección celular, también funciona como un proceso de muerte (dependiendo del estado celular o del ambiente extracelular y niveles de nutrientes). Por lo tanto, quizá es más correcto catalogar a este tipo de muerte como MCP mediada por autofagia y no autofagia como un modelo de muerte *per se* (Revisado en Cuervo A. M., 2004 y en Mizushima M. 2005).

3.1 Características de la autofagia.

A nivel estructural se observa la formación y acumulación de vesículas en el citoplasma, la degradación de contenidos citoplásmicos y una ligera condensación de la cromatina; el aparato de Golgi, poli-ribosomas y el retículo endoplásmico son degradados antes de la destrucción nuclear y en contraste con la apoptosis el citoesqueleto se preserva durante la autofagia (Revisado en Chowdhury *et al.* 2006 y Cuervo A. M., 2004).

3.2 Mecanismos genéticos y moleculares que regulan la autofagia.

A partir de estudios genéticos en levadura se identificaron aproximadamente 20 genes ATG/Apg (*Autophagy/Autophagy deficient mutants*) que son necesarios para la degradación de proteínas en condiciones de inanición y para la formación de los cuerpos autofágicos (Revisado en Cuervo AM., 2004 y Ohsumi 2001). Durante la autofagia ocurren dos mecanismos parecidos a la ubiquitinación (UBL *ubiquitin-like*) que son necesarios para la formación del autofagosoma. Los sistemas parecidos a ubiquitinación son proteínas que

forman conjugados con moléculas blanco a través de mecanismos que implican enzimas de tipo E1, E2 y E3¹⁵ (Revisado en Oshumi Y., 2001).

3.2.1 Sistemas de conjugación Atg12, Atg8

Uno de los mecanismos parecidos a ubiquitinación que ocurre durante la autofagia es el sistema de conjugación *Atg12*. En este sistema, una enzima de tipo E1, *Atg7*, cataliza la formación de un enlace tioéster entre *Atg12*-*Atg7*, después, *Atg12* se transfiere a *Atg10*, una enzima de tipo E2, quien a su vez cataliza la formación del conjugado *Atg12*-*Atg5*. A este último conjugado se une *Atg16* para la formación de un complejo proteico grande (*Atg12*-*Atg15*-*Atg16*) necesario para la elongación de la membrana de aislamiento que se forma en la macroautofagia.

El otro sistema parecido a ubiquitina es el *Atg8* (LC3 en mamíferos), donde *Atg7* tiene función de E1 mientras que *Atg3* hace la función de E2. Finalmente, un grupo amino de la fosfatidil-etanolamina (PE), un fosfolípido de membrana, está covalentemente unido a *Atg8*; por lo cual se localiza en estructuras membranales intermedias que surgen durante la formación del autofagosoma (**Figura 4**). Cabe mencionar que estos datos reafirmaron la idea de que la membrana del autofagosoma no está preformada sino que se ensambla a partir de una estructura precursora (Revisado en Oshumi *et al.* 2001 y Mizushima *et al.* 2005).

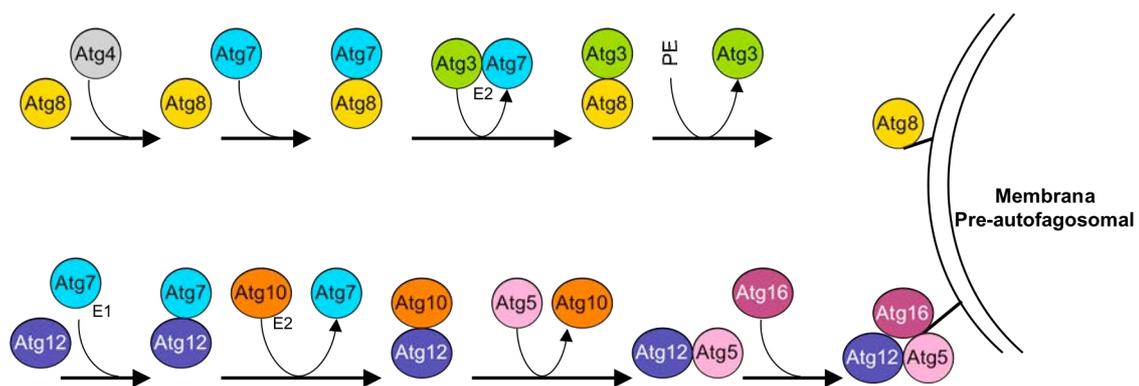


Figura 4. Sistemas de conjugación Atg. Durante el proceso de elongación de la membrana pre-autofagosomal, los complejos Atg8-PE y Atg12-Atg-5-Atg16 se asocian a la membrana de aislamiento.

¹⁵ E1 activa a la ubiquitina o una proteína tipo ubiquitina y cataliza la formación de un enlace de alta energía entre esa proteína y la E1. La E2 acepta/conjuga a esa proteína ubiquitina o parecida a ubiquitina y la transfiere a un sustrato usando una E3 (ligasa).

Ambos sistemas, Atg8 y Atg12, están altamente conservados en eucariontes superiores y se encuentran homólogos en mamíferos, nemátodos y plantas. En concordancia, el complejo Atg12-Atg5 también se forma en mamíferos y es necesario para la elongación de las membranas de aislamiento. Por otra parte, Atg8 es la proteína mejor conservada entre las Atg, en mamífero Atg8 consiste en una familia multigénica que incluye a GATE-16, GABARAP y MAP1-LC3, siendo esta última la única que participa en autofagia al procesarse proteolíticamente para producir una forma activa LC3-I que después se une a fosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE) y se produce una forma LC3-II que se asocia a la membrana del autofagosoma (Revisado en Mizushima *et al.* 2005).

3.2.2 La ruta de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K)

Las rutas de la PI3K clase I (activada por el receptor de insulina y las proteínas activadas por éste) y PI3K-III regulan la formación de estructuras del pre-autofagosoma y por lo tanto regulan la autofagia. Entre las proteínas involucradas en la señalización se encuentran: la PI3K clase I, PDK1, Rheb y mTOR que actúan como supresores de la autofagia mientras que los supresores tumorales PTEN, TSC1/TSC2 la inducen.

El complejo de la PI3K clase III está implicado en varias rutas de transducción de señales que regulan diversas funciones fisiológicas y además es necesario para la autofagia al igual que Beclin-1 (el homólogo de mamífero de Atg6), con quien forma un complejo que regula positivamente la expansión de membranas de aislamiento del pre-autofagosoma (**figura 5**). Este complejo se localiza en las cisternas *trans* del complejo de Golgi y facilita la re-localización de ciertas proteínas en las estructuras preautofagosomales (Kihara *et al.* 2001). Es importante mencionar que varias de las proteínas que participan en la regulación de la autofagia participan también en el mantenimiento de la homeostasis celular como TOR quien participa en la regulación de la síntesis de proteínas y el ciclo celular, entre otros procesos celulares (revisión de Mizushima 2005 y Gozuacik 2006).

Estos agregados inicialmente son removidos por chaperonas y proteasas, pero después cuando los niveles de los agregados son mayores, éstos atrapan a las chaperonas y proteasas; así la activación de la autofagia se convierte en un mecanismo posible para la eliminación de los agregados. Por lo tanto, las alteraciones y cambios en la morfología del compartimiento lisosomal que ocurren durante estas patologías alteran el efecto protector que pudiera tener la autofagia. Sin embargo, al progresar la enfermedad, la activación sostenida de la autofagia puede llevar a la saturación del proceso y a la activación de ésta como proceso de MCP (Revisado en Cuervo 2004). En conclusión, los reportes que reconcilian ambos papeles de la autofagia, muestran que su función como protector o inductor de MCP depende del estado de progresión de la enfermedad y del ambiente extracelular (Revisado en Cuervo A. M., 2004).

4. Muerte celular programada tipo 3 o Citoplásmica

Está descrita como una degeneración vesicular no-lisosomal y comparte ciertas características morfológicas de la autofagia; sin embargo, poco se sabe de los mecanismos de regulación de este tipo de MCP (Clarke PG 1990), por lo que no se describirá con mayor detalle. Finalmente, también hay que considerar que en la literatura están reportados muchos otros nombres de mecanismos de MCP; por ejemplo: paraptosis, oncosis, muerte mitótica, necroptosis, etcétera. Sin embargo, en nuestra consideración, estos otros tipos de MCP son variaciones o solapamiento de los mecanismos de los tres tipos de MCP antes descritos.

II. ANTECEDENTES

De acuerdo a criterios morfológicos, bioquímicos y de respuesta a inhibidores de apoptosis, ciertos tipos de muerte celular que no parecen ser apoptosis (Revisado en Sperandio *et al.* 2000). Por ejemplo, la muerte autofágica o citoplásmica que ocurre en el desarrollo y en algunos casos que ocurren en la neurodegeneración como en la esclerosis lateral amiotrófica (Dal Canto *et al.* 1994), la enfermedad de Huntington y en la muerte que ocurre por isquemia, no presenta características de apoptosis. De hecho, estos mismos reportes sugieren que tampoco se trata de necrosis (Turmaine *et al.* 2000 y Sperandio *et al.* 2000) y que más bien se trata de otro tipo de muerte celular programada ya que se requiere de expresión génica, tanto transcripción como síntesis de proteínas *de novo* (Sperandio *et al.* 2000).

1. Un modelo alternativo de muerte celular programada no apoptótica

El modelo de muerte celular programada que a continuación se describe no presenta características morfológicas de apoptosis; en contraste, se observan vesículas en el citoplasma y un hinchamiento de la célula, contrario al encogimiento característico de la apoptosis; se conserva la asimetría en la distribución de fosfatidilserina en la membrana plasmática y diversos inhibidores de caspasas no previenen la muerte celular. Este modelo de muerte más bien asemeja la muerte neuronal que ocurre en la neurodegeneración y no requiere de factores neuronales específicos, ya que ocurre tanto en cultivos primarios de neuronas corticales, del hipocampo y del estriado, como en células no neuronales como en células de la línea HEK 293 que expresen el receptor de neuroquinina¹ 1 (NK₁R) (Castro-Obregón *et al.* 2002).

De manera general la MCP en este modelo está activada por la sustancia P (SP), que es el ligando del receptor NK₁. La SP es un neurotransmisor² peptídico producto del *splicing* alternativo del gen pre-protaquinina A, que pertenece a la familia de péptidos de taquinina. Este neurotransmisor participa en estados patológicos donde ocurre muerte neuronal como la epilepsia y la isquemia. Por otra parte, NK₁R participa en diversos procesos biológicos como la transmisión del dolor y la regulación de la función cardiovascular y respiratoria y también está implicado en el reflejo emético y en la regulación de respuestas de comportamiento como la esquizofrenia y la depresión, y debido a que modula la liberación de otros

¹ Neuroquinina también es conocida como sustancia P

² Asociado a canales de Ca²⁺

neurotransmisores, *i.e.* aminoácidos excitatorios, NK₁R está involucrado en una variedad de funciones biológicas (Quartara *et al.* 1998). NK₁R es un receptor acoplado a proteína G y aparentemente tres sistemas de segundos mensajeros (movilización de Ca²⁺, ácido araquidónico ó acumulación de cAMP) pueden ser activados por proteínas G después de la unión del ligando al NK₁R. Sin embargo, en la muerte celular inducida por SP/NK₁R, la actividad del receptor es independiente de la activación de proteínas G y prescinde también de la activación de segundos mensajeros clásicos como el cAMP y tampoco se observa movilización de calcio intracelular (Castro-obregón *et al.* 2004).

La proteína de andamiaje arrestina 2 puede funcionar como modulador de la endocitosis mediada por receptores y mediador de la desensibilización de receptor. Además, las β-arrestinas pueden actuar de manera agonista como adaptadores de señalización que reclutan moléculas hacia los receptores acoplados a proteínas G (Zhang *et al.* 1997). En la muerte inducida por SP/NK₁R, arrestina 2 participa en la transducción de la señal de muerte como un adaptador de señalización al interactuar con el dominio carboxilo terminal del NK₁R y reclutar una cascada de fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las cinasas Raf1, MEK2 y ERK2 forman parte de la cascada de fosforilación que es necesaria para la progresión de la muerte y la eventual fosforilación del receptor huérfano Nur77, cuya transcripción es inducida durante la muerte (**Figura 6**) (Castro-Obregón *et al.* 2004).

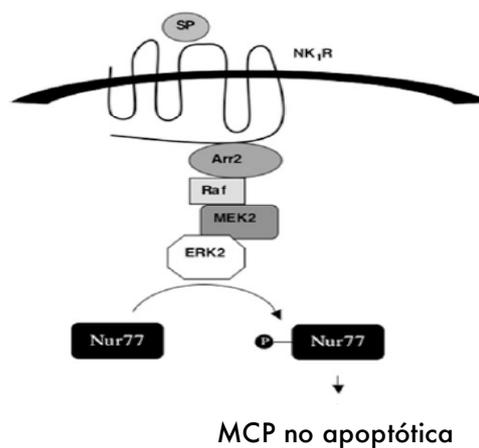


Figura 6. Mecanismo molecular de la MCP inducida por SP. NK₁R induce una cascada de fosforilación mediada por las cinasas Raf1, MEK2 y ERK2. Arrestina 2, recluta estas cinasas hacia el extremo citoplásmico de NK₁R. (Diagrama modificado de Castro-Obregón *et al.* 2004)

1.1 La cinasa ERK2

La familia de las MAP cinasas comprende a tres familias homólogas: p38, SAPK y ERK's que participan en diferentes procesos fisiológicos. Es característico que cada una de estas familias esté compuesta por una triada de cinasas que fosforilan³ y activan a la cinasa ubicada por debajo de ella. Por ejemplo, la ruta *ras-raf* está compuesta por Raf-1/MEK1-2/ERK1-2 cuya activación se inicia por la unión de ras activado a Raf-1 (Revisado en Lew 2003). ERK1/2 son cinasas reguladas por señal extracelular y en general regulan la proliferación celular en respuesta a señalización por mitógenos. Pueden ser activadas por factores de crecimiento, el suero y ésteres de forbol. Por otro lado, hay evidencia que receptores nucleares, como el receptor de estradiol- α , regulan la ruta de ERK1/2 a través de interacciones directas con elementos de señalización localizados arriba de la ruta de activación de Ras. Además, se sabe que la formación de diferentes complejos proteicos en la cascada ERK1/2 es esencial para la transmisión y función de la ruta de cinasas y estos complejos median respuestas específicas a diferentes ligandos y son dirigidos a diferentes sitios de acción en la célula (Revisado en Chen *et al.* 2001).

La localización subcelular de ERK1/2 depende del tipo celular y del estímulo. En los fibroblastos, ERK1/2 se encuentra asociado a microtúbulos en el citoesqueleto y una vez estimulados se induce la acumulación de ERK1/2 en el núcleo; por ejemplo, en células PC12 ERK1/2 nuclear es necesaria para la extensión de las neuritas. En contraste, en otros tipos celulares ERK1/2 se localiza en especializaciones de la membrana (como cilios, microvellosidades, desmosomas u otras uniones intercelulares) y nunca entra al núcleo. Diversas proteínas que se unen a ERK2 en el citoplasma alteran su distribución inducida por la activación misma de ERK2. MEK1 es una de las proteínas más importantes que determinan la localización de ERK1/2 y la sola expresión de MEK1 al parecer retiene a ERK2 en el citoplasma. Sin embargo, no es un mecanismo exclusivo ya que la propia ERK2 fosforilada forma homodímeros que promueven su acumulación nuclear por difusión a través de poros nucleares (Revisado en Chen *et al.* 2001).

A pesar de que MEK y ERK clásicamente habían sido asociadas a sobrevivencia celular más que a MCP, en la muerte inducida por SP/NK₁R, MEK2/ERK2 y no MEK1/ERK1 son necesarios para la progresión de la muerte. Por lo tanto, en caso de que

³ Las proteínas cinasas fosforilan a sus sustratos en residuos de serina, tirosina y treonina.

MEK1/ERK1 fueran mediadores de sobrevivencia, esto sugeriría que la proporción de ERK1/ERK2 determina el destino de la célula en esas condiciones (Castro-Obregón et al. 2004).

1.2 Nur77: un mediador clave en la muerte celular programada no apoptótica.

La participación de Nur77 en este modelo de muerte y su relevancia como mediador clave de mecanismos de MCP parte de varios hechos, previamente había sido reportada su inducción en respuesta a isquemia (Walton *et al.* 1999), en un modelo de epilepsia inducido por ácido kaínico (Honakaniemi *et al.* 1999) o por estimulación mecánica, además de su papel apoptótico en células de cáncer de próstata (Li *et al.* 2000) y en la selección negativa de timocitos (Woronicz *et al.* 1995). Por otra parte, también está reportado que Nur77 puede ser fosforilado por la cinasa ERK2 (Slagasvold *et al.* 2002). Finalmente, Nur77 es un gen que se expresa diferencialmente⁴ en respuesta a SP y además, tanto la expresión de dominantes negativos⁵ de Nur77 como el silenciamiento de éste por interferencia de RNA disminuyen significativamente la muerte inducida por SP/NK₁R (Castro-Obregón *et al.* 2004).

2. La familia de receptores nucleares Nur77

Nurr1, Nor-1 y Nur77 son receptores nucleares huérfanos de la superfamilia de receptores de hormonas esteroide/tiroideas cuya expresión, inducida por diversos estímulos, modula respuestas celulares aparentemente contrastantes como: la proliferación, diferenciación o la muerte (Hsu *et al.* 2004). Los miembros de la familia Nur77 pertenecen al grupo de receptores huérfanos debido a que no se han caracterizado ligandos fisiológicos para ellos, además de que el análisis estructural del dominio de unión a ligando (LBD) de Nurr1 reveló que no existe una estructura de anclaje clásica de unión del ligando lo cual sugiere que las funciones biológicas de los miembros de la familia Nur77 son independientes de ligandos (Revisado en Moll *et al.* 2006).

2.1 Características estructurales de Nur77

Nur77⁶ está formado por cuatro dominios: el de transactivación; el de unión a DNA; el de extensión C terminal y el de unión a ligando. (Revisado en Hsu *et al.* 2004). El dominio de unión a DNA (DBD) se encuentra altamente conservado entre los miembros de la

⁴ Según análisis de hibridación de microarreglos.

⁵ Nur77-ΔDBD y Nur77-Δ152, serán descritas posteriormente.

⁶ También se conoce como: NR4A1, NGFB-I, TR3, NR4A1, TIS1, NAK-1; etc.

subfamilia e incluye dos dedos de zinc y otros motivos necesarios (cajas P-, T- y A-) para la unión de secuencias específicas de DNA (Eells *et al.* 2000). Además, dos señales de localización nuclear (SLN 1 y 2) asociadas a la modulación de la señalización de retinoides están contenidas también en el DBD (Katagiri *et al.* 2000, Hsu *et al.* 2004). Por otro lado, el dominio de unión a ligando (LBD) contiene tres señales de exportación nuclear (SEN 1, 2 y 3) implicadas en la exportación de Nur77 del núcleo hacia citoplasma (Hsu *et al.* 2004). En general, los receptores nucleares tienen un dominio AF-1 en el extremo N-terminal que tiene función de activación transcripcional independiente de ligandos; mientras que hacia el extremo C-terminal, en el LBD, tienen un dominio AF-2 que tiene función de activación transcripcional dependiente de ligando. Nur77 y los otros miembros de la familia, presentan una topología del LBD que es sustancialmente diferente al LBD de los otros receptores nucleares y el sitio AF-2 del LBD es incapaz de mediar activación transcripcional dependiente de cofactores y es prescindible para su funcionamiento como transactivador; en contraste, el dominio AF-1 y sus dos sitios de transactivación son necesarios para mediar trans-activación y reclutamiento de co-activadores (**Figura 7**) (Wansa *et al.* 2003).

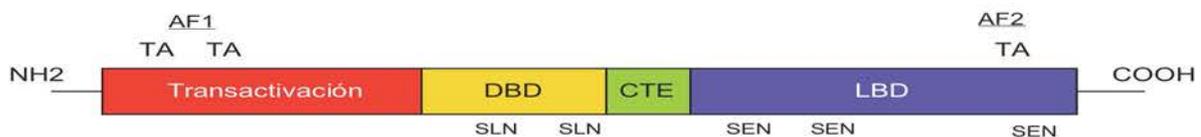


Figura 7. Estructura de Nur77. DBD es el dominio de unión a DNA, CTE es el dominio de extensión del lado carboxilo terminal; LBD es el dominio de unión a ligando. SLN y SEN son las señales de localización nuclear y de exportación nuclear, respectivamente. AF-1/2 son los sitios de activación de función y TA son los sitios de transactivación (Modificado de Hsu *et al.* 2004).

2.2 Expresión de Nur77 y su regulación

Los miembros de la familia de Nur77 son genes de expresión inmediata y su expresión puede ser inducida rápida y transitoriamente. Los elementos del promotor de Nur77 pueden ser regulados por rutas de respuesta rápida o tardía. Estas características permiten que Nur77 pueda coordinar la expresión de genes de expresión tardía en respuesta a señales extracelulares (Revisado en Eells *et al.* 2000). Nur77 se expresa en diversos tejidos en adulto, *e.g.* timo, músculo, pulmón, hígado, testículos, ovarios y en las glándulas: prostática, adrenales, tiroides y pituitaria.

A diferencia de otros receptores nucleares, la transcripción de Nur77 es compleja y está controlada por estímulos externos que influyen en la cinética de Nur77 variando desde una inducción transitoria hasta inducción de larga duración (Hsu *et al.* 2004). La expresión de los miembros de la familia Nur77 se induce por ácido kaínico o electrochoque, y además, *in vitro*, su expresión puede ser inducida por ésteres de forbol, despolarización de la membrana, ionóforos de calcio, hormonas peptídicas, neurotransmisores, campos magnéticos y estimulación mecánica. (Revisado en Eells *et al.* 2000).

La regulación transcripcional de Nur77 resulta de una interacción entre co-factores transcripcionales activadores y represores. Por una parte, el principal mecanismo de co-represión está asociado a una desacetilasa de histonas (HDAC) de la clase II que se asocia con Cabin1 y MEF2 que directamente bloquean el acceso de factores de transcripción al promotor Nur77. Por otra parte, la regulación positiva de Nur77 tiene que ver, principalmente, con rutas que inhiben el complejo de la HDAC II y con incrementos de cAMP e influjo de calcio, ó señales que inhiben a MEF2 (Revisado en Eells *et al.* 2000 y Hsu *et al.* 2004).

2.3 Regulación transcripcional por Nur77

Nur77 puede unirse a dos tipos de secuencias de DNA (los elementos responsivos de Nur77), ya sea como monómero al elemento NBRE⁷ ó como homodímero o heterodímero al elemento NurRE⁸ (Revisado en Eells *et al.* 2000). Nur77 es una proteína versátil y puede formar heterodímeros con los otros miembros de la familia como Nurr 1 y NOR1 pero también con el receptor de retinoides X (RXR).

Por otra parte, Nur77 puede formar un heterodímero con RXR α y éste heterodímero se une al elemento responsivo a ácido retinoico (RARE) del promotor del receptor de ácido retinoico β (RAR β) promoviendo la transcripción de este último que puede ser activado por retinoides selectivos a RAR. En este caso, la activación de RAR β inhibe el crecimiento (a través de inducción de apoptosis e inhibición del crecimiento celular) de células cancerosas resistentes a ácido *trans*-retinoico (Wu *et al.* 1997a). Por otra parte, Nur77 también modula la sensibilidad a ácido retinoico (AR) en células de cáncer de pulmón a través de un balance dinámico con el receptor huérfano COUP-TF.

⁷ NBRE: AAAGGTCA

⁸ NurRE: TGATATTTX6AAATGCCA

En este caso, Nur77 forma un heterodímero con COUP-TF y ésta interacción bloquea la unión del último a los RAREs inhibiendo así la actividad transcripcional de COUP-TF. Como resultado de la inhibición de la transcripción⁹ dependiente de COUP-TF, las células se desensibilizan al tratamiento con AR. En síntesis, las células que son insensibles a AR expresan Nur77 mientras que las que son sensibles a AR sobre-expresan COUP-TF (Wu *et al.* 1997b). Por otro lado, se conocen pocos genes que son blanco directo de Nur77; por ejemplo: POMC, NDG1, NDG2, GLUT4 y recientemente otros genes involucrados en glucólisis, gluconeogénesis y el transporte de glicerol fosfato (Chao *et al.* 2007 y revisado en Moll *et al.* 2006).

2.4 Regulación pos-traduccional de Nur77

Los mecanismos que regulan la actividad de Nur77 parecen no estar asociados a una interacción ligando-receptor debido a la carencia de ligandos fisiológicos de la familia como antes se mencionó. Esto sugiere que modificaciones postraduccionales como la fosforilación pueden tener un papel crucial en la regulación de la localización y función de Nur77, y además se sabe que la fosforilación es un mecanismo común de regulación de la actividad de proteínas (Revisado en Wingate *et al.* 2006 y Moll *et al.* 2006). Nur77 tiene varios sitios de fosforilación y el grado de fosforilación depende del estímulo. Por ejemplo, en respuesta al factor de crecimiento neuronal (NGF) y al factor de crecimiento epidérmico (EGF) se observan especies más y menos fosforiladas, respectivamente. Este grado de fosforilación determina la distribución subcelular de Nur77; es decir, las especies menos fosforiladas tienen una localización nuclear mientras que las más fosforiladas presentan una distribución citoplásmica (Fahrner *et al.* 1990, Katagiri *et al.*, 2000).

2.4.1 Fosforilaciones que afectan la función de Nur77

Los tres miembros de la familia Nur77 pueden sufrir fosforilación por la proteína cinasa A (PKA) en un residuo de serina de la caja A del DBD. Nur77, inducido por el factor de crecimiento neuronal (NGF) es fosforilado por PKA y reduce su afinidad de unión al DNA impidiendo la unión de Nur77 y volviéndolo transcripcionalmente inactivo (Revisado en Eells *et al.* 2000).

⁹ De genes como RAR β u otros genes que promueven crecimiento en respuesta a retinoides.

ERK2 en respuesta a factores de crecimiento como EGF en algunos tipos celulares fosforila residuos de treoninas de manera preferencial, mientras que bajo otros estímulos no mitogénicos, ERK2 fosforila preferencialmente residuos de serina en las proteínas blanco. En concordancia, en respuesta a la estimulación por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), ERK2 fosforila a Nur77 en la treonina 142 (T143 en humano) mientras que en respuesta a NGF en el residuo de serina 101 y Akt fosforila a Nur77 en el residuo de serina 350 (Slagsvold *et al* 2002). Por otra parte, la cinasa ribosomal S6 (RSK) fosforila a Nur77 *in vivo* en la serina 354. Específicamente, esta fosforilación no afecta la estabilidad de Nur77 ni su actividad transcripcional pero sí promueve la asociación de Nur77 con proteínas 14-3-3 *in vitro* (Revisado en Wingate *et al.* 2006).

2.5 Influencia de la distribución subcelular de Nur77 sobre su función

La distribución subcelular de Nur77 influye en su función biológica, sea proliferación, diferenciación o muerte. Varios datos sugieren que la localización nuclear de Nur77, a excepción de las células T, donde induce apoptosis, tiene efectos de supervivencia y proliferación, mientras que su translocación al citoplasma promueve la muerte celular (Revisado en Wingate *et al.* 2006) o la diferenciación en respuesta a NGF (Katagiri *et al.* 2000). Sin embargo, parece no ser el caso de que la localización de Nur77 tenga un efecto excluyente en su función.

2.5.1 Mecanismos reguladores de la exportación de Nur77.

En respuesta a NGF, Nur77 regula la señalización de retinoides como resultado de la co-exportación nuclear de un heterodímero formado con RXR que es guiado por las SEN del mismo Nur77 y la exportación está controlada por: la fosforilación de la serina 105, las SEN y las SLN de Nur77, Trk, Ras y la ruta de las MAP cinasas. Como resultado de la distribución y de la proporción núcleo-citoplasma del receptor de retinoides X (RXR), la transcripción dependiente de RXR-RAR (receptor de ácido retinoico) disminuye (Katagiri *et al.* 2000). En este mecanismo Nur77 actúa de manera indirecta como represor transcripcional al arrastrar fuera del núcleo el receptor de retinoides, previniendo así la interacción de RXR-RAR con su respectivo elemento responsivo (Katagiri *et al.* 2000).

Otro de los mecanismos de regulación de la exportación de Nur77 ocurre en respuesta a estímulos apoptóticos, donde la exportación nuclear de Nur77 está controlada por la acción de las cinasas: JNK (c-Jun N-terminal) y Akt.

Por un lado, la fosforilación de Nur77 en el dominio N-terminal por JNK es necesaria para inducir la exportación. Por el contrario, en respuesta a la activación de MEKK1, Akt fosforila a Nur77 en la serina 351, lo cual bloquea la exportación nuclear de Nur77. Así, las especies que pueden ser exportadas del núcleo deben estar fosforiladas en el dominio N-terminal pero no en la S351 (Han *et al.* 2006). De manera contraria, la exportación nuclear de Nur77 puede ser bloqueada mediante la co-expresión del transactivador transcripcional EBNA2¹⁰ y Nur77. En este modelo, en respuesta a estímulos apoptóticos como PMA ó infección por virus Sindbis, EBNA2 interactúa con Nur77 previniendo la exportación nuclear lo cual a su vez impide la localización de Nur77 con la mitocondria, protegiendo así de la muerte apoptótica inducida por Nur77 (Lee *et al.* 2002). Este mecanismo de apoptosis se detallará más adelante.

3. Modelos de función de Nur77 en la modulación de procesos biológicos.

Como anteriormente se mencionó, Nur77 es una proteína versátil que está implicada en una variedad de procesos fisiológicos como la transducción de señales: hormonales, inflamatorias, mitogénicas, apoptogénicas y de diferenciación. Es interesante mencionar que pareciera no haber un mecanismo que englobe la función de Nur77 y más bien su versatilidad de función lo sitúa como componente clave de la regulación homeostática celular. A continuación se presentan algunos paradigmas clásicos de la función de Nur77 que dan una idea de su versatilidad, actividad y repercusión en el organismo.

3.1 Inducción de la progresión del ciclo celular y proliferación

Nur77 modula efectos mitogénicos en respuesta a EGF y al suero. Kolluri y colaboradores demostraron que la expresión ectópica de Nur77 en células de cáncer de pulmón H460 y Calu-6 induce la progresión del ciclo celular y la proliferación celular. En este modelo, Nur77 ejerce su función mediante la unión a DNA y a través de su función de transactivación. La expresión constitutiva de la cinasa MEKK1 regula negativamente la actividad transcripcional de Nur77 a través de la activación de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) que fosforila a Nur77 en el dominio N-terminal (Kolluri *et al* 2003). Interesantemente, Nur77 es capaz de inducir proliferación y apoptosis en este mismo tipo celular dependiendo del estímulo y su localización subcelular como se verá detallado posteriormente.

¹⁰ Antígeno nuclear 2 del virus Epstein Barr.

3.2 Inducción de apoptosis por translocación a la mitocondria

Nur77 está implicado en la regulación de apoptosis en distintos tipos celulares y su expresión se induce en respuesta al retinoide sintético AHPN¹¹ en células de cáncer de pulmón. Particularmente, la apoptosis en células humanas de cáncer prostático (LNCaP) inducida por varios estímulos apoptóticos¹² es regulada por Nur77 a través de su translocación como heterodímero RXR α /Nur77 (formado por el solapamiento de ambos DBD's) del núcleo hacia la mitocondria (Li *et al.* 2000 y Cao *et al.* 2004). La migración de este dímero es guiada mediante una SEN localizada en el dominio carboxi-terminal de RXR α (Cao *et al.* 2004). Una vez en la mitocondria, Nur77 se une al bucle de Bcl-2 lo cual induce un re-arreglo conformacional del surco de unión hidrofóbico que expone el dominio BH3 y media la liberación de citocromo *c* de la mitocondria, necesario para la formación del apoptosoma y consecuente activación de apoptosis (Lin *et al.* 2004).

Por otra parte, es interesante mencionar que en presencia de los ligandos de RXR α (SR11237 o 9-*cis*-RA), la formación del heterodímero antes descrito ocurre en las interfaces de sus LBD¹³ con lo cual se silencia la SEN y por lo tanto se inhibe la translocación del heterodímero hacia la mitocondria con el consecuente bloqueo de la apoptosis (Cao *et al.* 2004). Esta apoptosis mediada por Nur77 es independiente de regulación transcripcional ya que el DBD de Nur77 es prescindible y además la mutante Nur77- Δ DBD (mutante dominante negativa de localización exclusivamente citoplásmica y que inhibe la actividad transcripcional de Nur77 silvestre) es un potente inductor de apoptosis (Li *et al.* 2000).

En este mismo paradigma de muerte, otro reporte sugiere que la proteína PML interactúa directamente con Nur77 y lo arresta en los cuerpos nucleares PML inhibiendo la actividad transcripcional dependiente de Nur77. Aunque parezca contradictorio que la expresión de Nur77 con PML aumente la muerte apoptótica, estando Nur77 retenido en los cuerpos nucleares, podría ser que una porción de Nur77 inducido que está en el citoplasma es el responsable de la muerte apoptótica observada, aunque eso no explica el sinergismo que se observa durante la co-expresión de PML y Nur77 (Wu *et al.* 2002).

¹¹ Utilizado en quimioterapia.

¹² Como el análogo de AHPN, MM11453, el retinoide MM11384, el éster de forbol TPA, el ionóforo de calcio A23187 y el etopósido VP-16.

¹³ Y no es sus DBD como en el caso anterior.

3.3 Selección negativa de timocitos dependiente de la actividad transcripcional de Nur77

El proceso de selección negativa de timocitos consiste en la eliminación clonal de timocitos inmaduros que expresan receptores de células T (TCR) auto-reactivos, es decir, con alta afinidad por antígenos propios o por el complejo mayor de histocompatibilidad. Este proceso de selección está mediado, en parte, por señales apoptóticas que llegan a los TCR auto-reactivos. De manera experimental se puede inducir apoptosis en timocitos inmaduros y en muchos hibridomas de células T usando anticuerpos contra el complejo TCR-CD3 (anti-CD3). Esta activación de “apoptosis inducida” requiere de la expresión de Nur77 y de su actividad transcripcional (Woronicz *et al.* 1995).

En este caso, inicialmente se observó que la población de células $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^+$ y $CD4^+CD8^-$ disminuye en ratones transgénicos que sobre expresan Nur77 en los timocitos, donde a la vez se observa un incremento en la expresión de FasL. Además, al cruzar ratones transgénicos de Nur77 con ratones que poseen una mutación puntual que afecta el dominio extracelular de FasL e impide su unión a Fas, observaron que las subpoblaciones, antes mencionadas, de timocitos se mantienen en niveles casi normales (no ocurre muerte). Es decir, a pesar de que FasL endógeno no es funcional, las subpoblaciones tímicas se mueren en una proporción casi al igual que en el ratón transgénico de Nur77; por lo cual coloca genéticamente a Nur77 en una posición “arriba” de FasL. Por lo tanto, los autores sugirieron que la apoptosis de los timocitos del ratón transgénico de Nur77 requiere de la ruta Fas/FasL y que además, Nur77 también podría estar mediando otras rutas de transducción de señales que induzcan apoptosis (Weih *et al.* 1996). Sin embargo, posteriormente se demostró que la sobreexpresión de Nur77 no induce a FasL y que la apoptosis de los timocitos mediada por Nur77 no requiere de FasL ya que la expresión constitutiva de Nur77 en ratones mutantes de FasL rescata el fenotipo linfoproliferativo (los timocitos se mueren) que se observa en los ratones mutantes. Esta discrepancia quizá se deba a los niveles de expresión¹⁴ de Nur77 en ambos reportes, por ejemplo, niveles altos de Nur77 activan la ruta de Fas; sin embargo, los últimos autores proponen que la mayoría de la apoptosis que observan es independiente de Fas (Cheng *et al.* 1997)

¹⁴ Resultado de los promotores utilizados en las construcciones de los vectores de expresión en los ratones transgénicos.

Por otra parte, el análisis de hibridaciones de microarreglos usando RNA de timocitos Nur77 transgénicos y silvestres demostraron la inducción de los genes NDG1 y NDG2 que se inducen en la expresión de Nur77. Aunque no se sabe si ambos genes son blanco directo de la actividad transcripcional de Nur77. A pesar de que NDG2 se dirige a mitocondria no se ha definido si tiene un papel en la apoptosis. Por otra parte, NDG1 exhibe actividad apoptótica por activación de caspasas -8 y -3. Sin embargo, la sobre expresión de NDG1 en células T no produce apoptosis masiva. Por lo tanto, otros eventos mediados por Nur77, aun no elucidados, podrían estar implicados en la apoptosis inducida en células T (Revisado en Moll. *et al* 2006).

3.4 Nuevos paradigmas de función de Nur77

Otro paradigma de función de Nur77 es el modelo alternativo de MCP no-apoptótica activada por SP/NK₁R anteriormente descrito. Más recientemente, se han encontrado nuevas proteínas que interactúan directamente con Nur77 y se han encontrado nuevos procesos biológicos donde participa Nur77. Por ejemplo, se reportó que el LBD de Nur77 interactúa directamente con la región catalítica de la proteína cinasa C (PKC), específicamente con el asa rica en glicinas que es el motivo de unión a ATP. Como resultado de esta interacción se pierde la actividad de cinasa de la PKC; y por otra parte, disminuye la activación transcripcional de blancos de la PKC como NFκB y de la proteína de activación 1 (AP-1). Esta inhibición de actividad de la PKC y por lo tanto de la fosforilación de sus sustratos, podría ser un componente importante para entender cómo Nur77 regula varios efectos celulares (Kim *et al.* 2006).

Otra interacción interesante es el caso de Nur77 con p53; p53 tiene mayor afinidad por Nur77 que por MDM2, por lo tanto Nur77 secuestra a p53 y bloquea su sitio de acetilación, disminuyendo así la actividad transcripcional de p53. Debido a esto, genes como MDM2, cuyo producto promueve la degradación de p53, no son expresados; y además Nur77 induce la auto degradación de MDM2 por ubiquitinación. Por otra parte, la expresión dependiente de p53 de *p21waf1/cip1* (un gen que arresta el ciclo celular) es reprimida por Nur77, sin embargo, este último no tuvo un efecto en la regulación de la progresión del ciclo celular. Por otro lado, el efecto de Nur77 sobre la transcripción (mediada por p53) de genes proapoptóticos no fue evaluado directamente; sin embargo, sí se observó que Nur77 indujo la activación de apoptosis vía p53 en respuesta a luz UV (Zhao *et al.* 2006). Por lo tanto, Nur77 también podría ser un factor esencial antitumoral al promover la estabilización de p53.

Por otra parte, y quizá relacionado, recientemente fue reportado que ratones mutantes doble negativos Nur77^{-/-}, Nor1^{-/-} desarrollan rápidamente leucemia mieloide aguda letal, como resultado de una expansión anormal de células troncales hematopoyéticas y de precursores mieloides, disminución en la expresión de factores de transcripción AP-1 (JunB y c-Jun) y señalización deficiente (FasL¹⁵ y TRAIL) de la vía extrínseca de la apoptosis. Además, más interesante resulta que en blastos leucémicos de pacientes humanos se observa disminución en la expresión de Nur77 y Nor1. Por lo tanto los autores sugieren que tanto Nur77 como Nor1 son supresores tumorales críticos de la leucemogénesis mieloide (Mullican *et al.* 2007).

¹⁵ Como anteriormente se mencionó, parece ser que la activación de la ruta de Fas depende de un nivel de expresión alto de Nur77 en el ratón transgénico.

III. JUSTIFICACIÓN

Nur77 es un receptor nuclear y de manera constitutiva reside en el núcleo. Sin embargo, en otros paradigmas de MCP mediada por Nur77, éste se transloca al citoplasma. En el paradigma de muerte celular inducida por SP/NK₁R se desconoce la localización subcelular de Nur77, es decir, no se sabe si permanece en el núcleo o es exportado del núcleo al citoplasma. Sin embargo, tomando en cuenta una serie de hechos y evidencias, que a continuación se detallan, era viable considerar que Nur77 podría translocarse del núcleo al citoplasma, pero también podría estar actuando en el núcleo, durante la MCP no apoptótica.

Por una parte, una mutante dominante negativa que carece del dominio de unión a DNA (Nur77-ΔDBD, de localización exclusivamente citoplásmica) inhibe la MCP inducida por SP/NK₁R. Esto sugiere que la localización nuclear de Nur77, su actividad transcripcional o ambas son necesarias para la progresión de la muerte. Por otra parte, otra mutante dominante negativa de Nur77 que carece del sitio de transactivación (Nur77-Δ152, de localización exclusivamente nuclear, pero sin actividad transcripcional) inhibe la translocación de Nur77 a la mitocondria en la muerte apoptótica independiente de la actividad transcripcional de Nur77 y también protege la MCP inducida por NK₁R/SP; sugiriendo, en este caso, que la localización de Nur77 en el citoplasma también es necesaria para la progresión de la muerte celular. Por lo tanto, si bien el mecanismo por el cual Nur77 modula esta forma alternativa de MCP podría depender de la actividad transcripcional de Nur77, el efecto de la mutante Nur77-Δ152 dejó abierta la posibilidad de que Nur77 también se transloca a algún organelo como en el caso de la apoptosis.

Por otro lado, se sabe que ERK2 es necesaria para la progresión de la MCP no apoptótica y además, también se sabe que durante este tipo de muerte, ERK2 fosforilada activa se asocia con el complejo de arrestina 2, localizado en los endosomas. Por lo tanto, debido a que Nur77 se fosforila durante la MCP y a que Nur77 puede ser fosforilado *in vitro* por ERK2, consideramos la posibilidad de que Nur77 interactuara directamente con ERK2. En este caso, la exportación de Nur77 del núcleo al citoplasma explicaría la interacción de Nur77 con ERK2.

Por otra parte, considerar a Nur77 como ejecutor de la muerte autofágica, implicaba que éste podría translocarse a organelos, como lisosomas o al aparato de Golgi, que participan directamente en el proceso autofágico. Por lo que ahí, Nur77 interactuaría con complejos implicados en la degradación de sustratos o en la progresión de la expansión de membranas que forman el autofagosoma.

La muerte celular que ocurre en ciertas patologías neurodegenerativas presenta características morfológicas de la muerte celular autofágica que ocurre en el desarrollo. Por otro lado, el modelo de muerte celular programada mediada por el receptor nuclear Nur77 reproduce la muerte que ocurre en esas patologías. Por lo tanto, conocer los mecanismos moleculares de la función de Nur77 ayudaría a entender cómo éste actúa en la modulación de la MCP que ocurre en la neurodegeneración. Finalmente, el hecho de que Nur77 pudiera estar actuando tanto en citoplasma como en núcleo durante la MCP no apoptótica, convirtió más interesante la pregunta de saber dónde actúa Nur77 durante la MCP inducida por NK₁R/SP.

IV. HIPÓTESIS

Durante la MCP inducida por SP/NK₁R, Nur77 es exportado del núcleo hacia el citoplasma.

V. OBJETIVOS

General

Estudiar la distribución intracelular de Nur77 en la muerte inducida por SP/NK₁R.

Particulares

1. Establecer las condiciones experimentales para detectar la inducción de Nur77 durante la muerte inducida por NK₁R/SP mediante inmunocitofluorescencia.
2. Teñir diferencialmente los organelos: mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, endosomas, lisosomas y núcleo.
3. Determinar si Nur77 se localiza en algún organelo específico durante la muerte celular.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

I. Estrategia experimental

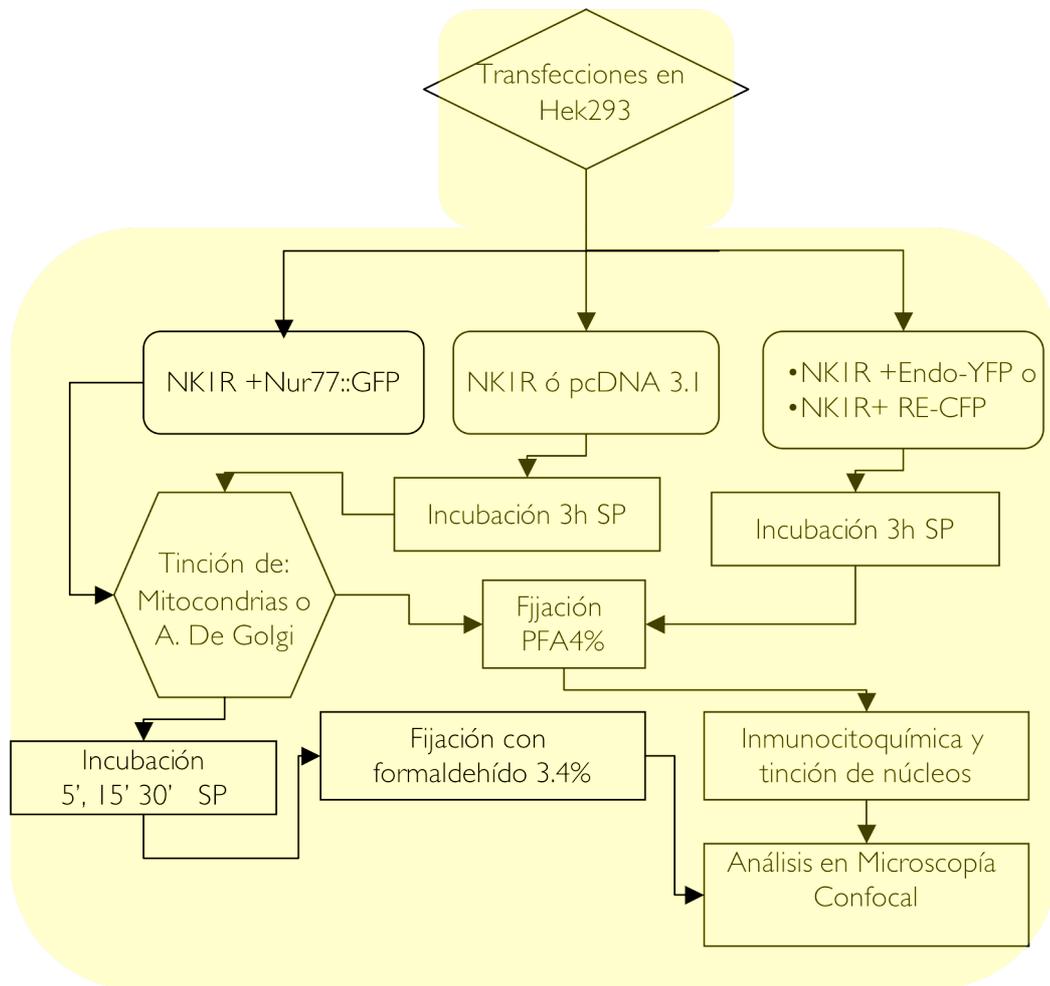


Figura 8. Resumen de la estrategia experimental. Para determinar la localización de Nur77, se transfectó Nur77::GFP y NK₁ y las células se incubaron con SP. La localización *in situ* de Nur77 endógeno se determinó realizando inmunocitoquímica en células que fueron transfectadas con NK₁R e incubadas durante 3h con SP. Las mitocondrias y el aparato de Golgi se tiñeron con colorantes específicos mientras que para identificar endosomas y RE se transfectaron plásmidos expresan proteínas marcadoras, específicas de esos organelos, fusionadas a una proteína fluorescente, YFP o CFP, respectivamente.

1. Microbiología

Soluciones:

Medio LB

Para 1 L:

- 10 g de NaCl
- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
 - Añadir H₂O deionizada a un volumen final de 1 L
 - Ajustar el pH a 7.0 con 5 N NaOH
 - Autoclavear

Agar LB

Para 1 L:

- 10 g de NaCl
- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 20 g de agar
 - Añadir H₂O deionizada a un volumen final de un litro
 - Ajustar el pH a 7.0 con 5 N NaOH
 - Autoclavear
 - Verter en cajas Petri (~25 ml/ caja 100-mm)

Caja de selección LB/Ampicilina 100 µg/ml

*La concentración del antibiótico varía de acuerdo al plásmido que se use.

Para 250 ml:

- Derretir 250 ml de Agar LB
- Enfriar a 55°C
- Añadir 250 µL ampicilina 100 µg/µL
- Verter en cajas Petri (~25 ml/ caja 100-mm)

1.1 Preparación de bacterias competentes

Se prepararon bacterias competentes mediante el método descrito en Nishimura *et al.* 1990. La eficiencia esperada es del orden de magnitud 10^8 UFC / µg DNA

1.2 Transformación de bacterias quimiocompetentes mediante el método de CaCl₂

Material:

- Bacterias quimiocompetentes
 - Medio LB
 - Cajas de selección LB/Ampicilina
 - Bloque térmico
-

- 1 Descongelar 45 μL de bacterias quimiocompetentes en frío, mezclar con 0.1–10 ng DNA e incubar 30' en hielo
- 2 Precalentar medio LB a 37°C
- 3 Dar un pulso de 45'' a 42°C
- 4 Incubar en hielo 2'
- 5 Agregar a cada tubo 1 ml de medio LB (sin antibióticos) precalentado e incubar 1 h a 37°C en agitación.
- 6 Platear 10-100 μL en caja de selección e incubar 12-16 h a 37°C

1.3 Almacenamiento de bacterias en glicerol

Material:

- Asa bacteriológica o puntas estériles
 - Tubos de congelación (Corning #2028)
 - Medio LB
 - Glicerol estéril
 - Antibiótico específico (Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o kanamicina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- 1 Tomar con un asa bacteriológica o con una punta estéril de micropipeta una colonia de una caja sembrada la noche anterior
 - 2 Inocular 3 ml de medio LB (con antibiótico respectivo, ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con la colonia recién tomada e incubar 8h en agitación a 37°C.
 - 3 Tomar 800 μL del inóculo anterior y ponerlo en un tubo de congelación de 1.5 ml (Corning #2028)
 - 4 Agregar 200 μL de glicerol estéril y mezclar bien.
 - 5 Almacenar a -70°C

1.4 Purificación de plásmidos.

La purificación de plásmidos se llevó a cabo utilizando columnas del paquete Maxi-Prep (Qiagen 12163). A continuación se detalla el protocolo para extraer plásmidos de 250 ml de bacterias crecidas en medio LB de selección.

Material:

- Asa bacteriológica o puntas estériles
- Medio LB
- Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- Tubos de centrifugación 250 ml y 30 ml

- Rotores JA-14, JA-20
- Soluciones P1, P2, P3
- *Buffers* QBT, QC y QF
- Isopropanol
- Etanol 70%
- H₂O grado biología molecular

1. Tomar con un asa bacteriológica o con una punta estéril de micropipeta una colonia de una caja sembrada la noche anterior.
2. Inocular 3-5 ml de medio LB (con antibiótico) con la colonia recién tomada e incubar 8h en agitación a 37°C.
3. Tomar 250 µL del inóculo anterior y agregarlo a 250 ml de medio LB de selección (Ampicilina 100 µg/ml) contenidos en un matraz de 1000 ml e incubar toda la noche a 37°C en agitación.
4. Para recuperar las bacterias, vaciar el medio en un tubo de centrifugación y centrifugar 15' a 12,000 rpm en un rotor JA-14 (Beckmann Series) a 4°C. *El protocolo se puede detener en este paso y el botón celular se puede guardar no más de una noche a -20°C.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 10 ml de buffer P1, agitar bien o dar un pulso en el *vortex* hasta eliminar los grumos.
6. Añadir 10 ml de buffer P2, tapar e invertir el tubo de 4-6 veces hasta que la suspensión se vuelva azul (en caso de que el buffer P1 contenga el *LyseBuffer*) y dejar incubar por 5' a temperatura ambiente.
7. Añadir 10 ml de buffer P3 frío y invertir el tubo de 4-6 veces e incubar en hielo por 20'.
8. Centrifugar a 15' a 12,500 rpm a 4°C en un rotor JA-14 (Beckmann Series).
9. Poner la columna en un matraz y equilibrar la columna con 10 ml de buffer QBT.

10. Una vez concluida la centrifugación decantar el sobrenadante en un jeringa de 20 ml que contenga una gasa en el interior, aplicar el contenido en la columna y dejar que fluya por gravedad.
11. Lavar la columna 1 vez con 30 ml de buffer QC. Una vez eluído el buffer QC, transferir la columna a un tubo de centrifugación de 30 ml (Nalgene 3114-0030) y eluir el DNA con 15 ml de buffer QF. *El protocolo se puede detener en este paso y el eluído se puede guardar a 4°C no más de una noche.
12. Precipitar el DNA añadiendo 10.5 ml (0.7 volúmenes) de isopropanol a TA. Mezclar y centrifugar inmediatamente a 11,500 rpm por 30' a 4°C en un rotor JA-20 (Beckmann Series).
13. Decantar el sobrenadante cuidando no despegar el precipitado de DNA.
14. Lavar el precipitado de DNA con 5 ml de etanol 70% y centrifugar a 11,500 rpm por 10' a 4°C en un rotor JA-20 (Beckmann Series).
15. Decantar cuidadosamente el sobrenadante y dejar el tubo destapado de 2' - 5' para secar el precipitado de DNA.
16. Redisolver el DNA en un volumen apropiado (aproximadamente 70 µL de agua grado biología molecular).
17. Determinar la concentración del DNA por espectrofotometría de luz UV a 260 nm. Para obtener una estimación confiable, las densidad óptica, A_{260} deben ser de 0.1 a 1.0 y la proporción $A_{260}/_{280}$, debe ser ≥ 1.7 .

2. Cultivo celular

Medios y soluciones:

PBS 10X (Buffer salino de fosfatos)

Para 1 L:

80 g de NaCl

2 g de KCl

14.4 g de Na₂HPO₄

2.4 g de KH₂PO₄

- Aforar a 1 L con H₂O grado de cultivo
- Disolver y esterilizar por filtración (membrana 0.22 µm)

Tripsina 0.25%

Para 20 ml:

- Disolver 2 ml de tripsina 2.5% (GIBCO #15090-0460) en H₂O grado de cultivo
- Añadir 18 ml de verseno (GIBCO #15040-066)

Medio D-MEM

Para 1 L:

1 sobre de medio DMEM (GIBCO #12100-046)

3.7 g de NaHCO₃

- Disolver el medio en polvo en 800 ml de H₂O grado de cultivo
- Añadir el NaHCO₃ y agitar hasta disolver
- Ajustar el pH a 6.9 con HCl 1N
- En campana, aforar a 1 L y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm
- Almacenar a 4°C no más de 2 meses

GPS 100X (glutamina + penicilina + estreptomicina)

Para 100 ml:

100 ml de GlutaMax 200 mM (GIBCO #35050-061)

300 mg de penicilina

500 mg de estreptomicina

- Transferir 10 ml de Glutamax a un tubo de 15 ml
- Agregar la penicilina y la estreptomicina. Disolver.
- Esterilizar por filtración (membrana de 0.22 µm) y agregar la solución restante de Glutamax. Mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.
- Hacer alícuotas y almacenar a -20°C
- Para utilizar, descongelar y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

Medio suplementado

1 sobre de D-MEM

10% SFB

GPS 1X

1% Piruvato de sodio (Gibco #11360-070)

Para 250 ml:

- 220 ml de D-MEM
- 25 ml de SFB
- 2.5 ml de GPS 100X
- 2.5 ml de piruvato de sodio

Poli-D-Lisina 100 µg/ml

Para 1 ml

- 100 µL Poli-D-lisina (1 µg/µL)
- 900 µL PBS

PBS/azul tripano 10%

Para 10 ml:

- 1 ml Azul tripano(Gibco #1302013)
- 9 ml de H₂O grado de cultivo
- Filtrar con membrana de 0.22 µm

Cloruro de Calcio 2M

Para 15 ml:

- 4.4106 gr de CaCl₂
- Aforar a 15 ml con H₂O bidestilada.
- Filtrar con membrana 0.22 µm

HBS 2X

- 280 mM NaCl
- 10 mM KCl
- 1.5 mM Na₂HPO₄
- 12 mM Dextrosa
- 50 mM HEPES
- Ajustar el pH con NaOH 1N y hacer una curva de distintos pH's (6.90, 6.95, 7.00, 7.10). seleccionar la solución que de la mayor eficiencia de transfección. Filtrar y almacenar en alícuotas de 1 ml a -70°C (máximo 6 meses).

DMEM+10% SFB

Para 50 ml:

- 45 ml DMEM
- 5 ml SFB

SP 100 nM/medio suplementado

Para 10 ml:

- 9990 µL medio suplementado
- 10 µL SP 100 µM

Medio de congelación 2X

Para 10 ml:

- 6 ml de DMEM
- 2 ml FBS
- 2 ml DMSO (Sigma #D2650)

Medio suplementado/formaldehído 3.8%

Para 10 ml:

- 1 ml formaldehído 38%
- 9 ml medio suplementado

2.1 Cultivo de células HEK 293

Para todos los experimentos que implicaron cultivo celular se utilizó la línea HEK293 proveniente de células endoteliales de riñón de embrión humano.

Material:

- PBS
- Tripsina 0.25%
- Medio suplementado
- Tubos de 15 ml (Corning #430790)
- Pipetas estériles de plástico de 5 y 10 ml
- PBS/Azul tripano 10%
- Cámara *Neubauer*
- Plato de 10 cm. (Corning #430167)
- Poli-D-lisina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Subcultivo de células.

1. Aspirar el medio utilizando la bomba de vacío.
2. Lavar con 1 ml de PBS a temperatura ambiente y aspirar.
3. Para despegar las células añadir 1 ml de tripsina 0.25% en PBS a cada plato de 10 cm. (Corning #430167)
4. Mover el plato para cubrir la caja con la tripsina e incubar a 37°C por 2'.
5. Agregar 3 ml de medio suplementado para inactivar la tripsina y dispersar las células resuspendiendo suavemente con pipeta.
6. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml (Corning #430790) y centrifugar 4' a 220 x g.
7. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.

8. Resuspender el *botón* celular en 10 ml de medio suplementado.

Cuantificación de la densidad y viabilidad celular por exclusión de azul tripano.

1. Tomar de 10 μ L de la suspensión anterior y ponerla en un tubo nuevo de 0.5 ml.
2. Agregar al tubo nuevo 10 μ l de PBS/ azul tripano al 10% (GIBCO #15250-061) y mezclar.
3. Tomar 10 μ L de la mezcla y depositar en la cámara de *Neubauer*
4. Contar las células vivas de los cuatro cuadrantes externos y el central (las células vivas se observan brillantes mientras que las muertas azules) que equivale a un volumen de 0.5 μ L.
5. Para determinar el número de células por ml utilizar la siguiente fórmula:

$$(N)(X)(2000)= \text{células/ml}$$

Donde:

N= número de células contadas en 5 cuadrantes (equivalente a 0.5 μ L)

X= número de partes de la dilución del Azul tripano/suspensión celular (*i.e. si se mezclan 10 μ L de azul tripano/PBS con 10 μ L de la suspensión celular, $x=2$*)

2000= (1000)/(0.5) = (1 ml=1000 μ L)/(volumen de las células contadas en 5 cuadrantes de la cámara Neubauer)

6. Sembrar una densidad celular de acuerdo al experimento.

Para mantener la línea sembrar:

- 1 x 10⁶ células por plato de 10 cm. (Corning #430167) completando 10 ml de medio suplementado.

9. Incubar a 37°C con 5% de CO₂

2.2 Transfección transitoria de células HEK293T

Las condiciones de transfección transitoria con CaCl₂ fueron estandarizadas utilizando el plásmido pQBI25-GFP que expresa la proteína verde fluorescente bajo un promotor constitutivo CMV.

Material:

- H₂O grado de cultivo
- CaCl₂ 2M
- HBS 2X
- Cajas de crecimiento de 6 cm
- Cubreobjetos con cámara de crecimiento de 4 u 8 pozos

1. Sembrar 4.5×10^5 células por pozo en cajas de 6 pozos completando un volumen final de 2 ml.

2. Mezclar, para cada muestra:

H2O	38.75 μ l
CaCl₂ 2M	6.25 μ l
DNA (co-transfección)	5 μ g (3 μ g de cada plásmido)

4. Incubar 10' a temperatura ambiente y después agregar:

HBS 2X	50 μ l
---------------	------------

5. Incubar 2' a 37°C y después agregar por goteo 100 μ l de la mezcla a cada pozo

6. Incubar a 37°C con 5% de CO₂.

7. Cambiar el medio 17 h después de la transfección y agregar 1 ml de medio suplementado

- Para cubreobjetos con cámara de crecimiento sin sustrato:

Las condiciones de transfección (volumen y densidad de sembrado y cantidad de DNA) en los cubreobjetos con cámara fueron estandarizadas utilizando el plásmido pQB125-GFP que expresa la proteína verde fluorescente bajo un promotor constitutivo CMV.

1. 24 h antes de sembrar las células tratar los cubreobjetos con 100 μ g/ml de Poli-D-lisina/PBS e incubar de 6-24 h a 37°C.

2. Lavar el cubreobjetos 1 vez con PBS y sembrar:

- 9×10^4 células por pozo de 1.8 cm² (Nunc #155383) en 800 μ l de medio de crecimiento
- 3.5×10^4 células por pozo de 0.8 cm² (Nunc #155411) en 600 μ l de medio de crecimiento

3. 24 h después de sembrar aspirar el medio con propipeta de 1 ml y agregar la mitad del volumen de medio en que fue inicialmente sembrado.

2.3 Inducción de muerte con SP

Material:

- SP 100 μ M
- Medio suplementado
- SP 100 nM/medio suplementado

1. Sembrar células en pozos de 6 en 1.5 ml de medio suplementado.
2. 17 h después de la transfección retirar el medio y rápidamente agregar 2/3 (del volumen en el que fueron sembradas inicialmente) de medio suplementado fresco.
3. 24 h después de la transfección (7 h después de cambio del medio) 1/3 del volumen (en que inicialmente fueron sembradas) de SP 3X/medio suplementado.

2.4 Conteo de células muertas

1. 24 h después de agregar la SP, agitar ligeramente la caja para despegar las células muertas.
2. Recolectar el medio y pasarlo a un tubo de 1.5 ml
3. Centrifugar 4' a 2000 rpm
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 50 μ L PBS/10% azul tripano
5. Depositar 10 μ L en la cámara de Neubauer y contar las células azules (muertas) de 5 cuadrantes.
6. Para determinar el número de células muertas utilizar la siguiente fórmula:

$$(N)(X)(3000)= \text{no. total de células muertas (en 1.5 ml)}$$

Donde:

N= número de células muertas contadas en 5 cuadrantes (equivalente a 0.5 μ L)

X= número de partes de la dilución del Azul tripano/suspensión celular (*en este caso hay una sola parte, entonces x=1*)

3000= (1500)/(0.5) = (1.5 ml=1500 μ L)/(volumen de las células contadas en 5 cuadrantes de la cámara Neubauer)

2.5 Descongelación y expansión de células HEK 293

Material:

- Vial con células congeladas
- Vial de congelación
- Tubo de 15 ml
- Medio suplementado
- Caja de cultivo de 10 cm.

1. Descongelar un vial de células en baño de agua a 37°C por 1- 2'.

2. Transferir la suspensión celular a un tubo estéril de 15 ml.
3. Añadir 5 ml del medio suplementado y mezclar.
4. Centrifugar 4' a 220 x g.
5. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
6. Resuspender el botón celular en 10 ml del medio correspondiente.
7. Sembrar en un área de acuerdo al número de células contenidas en el vial, para un plato de 10 cm. (Costar #430167) sembrar 3×10^6 células.
8. Cambiar el medio al día siguiente para eliminar las células muertas.
9. Tripsinizar las células y resembrar 1×10^6 células en platos de 10 cm. (Corning #430167) para expandir.

2.5.1 Congelación de células HEK 293

Material:

- Tripsina 0.25%
- PBS/Azul tripano 10%
- Cámara *Neubauer*
- Vial de congelación de 1.5 ml (Corning #2028)
- Medio de congelación 2X

1. Tripsinizar las células como anteriormente se describió
2. Centrifugar 4' a 220 x g y retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío
3. Cuantificar la densidad y viabilidad celular por exclusión de azul tripano y resuspender el *botón* de células en el volumen necesario de medio suplementado para obtener una densidad celular de 6×10^6 células/ml.
4. Agregar un volumen de las células y después agregar lentamente por la pared un volumen de medio de congelación 2X, mezclar constantemente la suspensión celular.
5. Hacer alícuotas de 1 ml (3×10^6 células) por vial de congelación.
6. Congelar a -70°C 1 durante 24 h y después almacenar en nitrógeno líquido

3. Inmunocitoquímica y tinción de organelos.

Soluciones:

Paraformaldehído (PFA) 4%

Para 100 ml

- 4 g paraformaldehído
- 50 ml H₂O bidestilada
- Calentar a 65°C
- Añadir 100 µL de NaOH 10 N
- Enfriar
- Añadir 50 ml de PBS 2X
- Ajustar el pH a 7.2 con HCl
- Aforar con H₂O a 100 ml
- Filtrar con membrana 0.22 µM
- Alicuotar y guardar a -20°C

PBS/Tritón 0.5%

Para 10 ml:

50 µL tritón-X100
9950 µL PBS

PBS/Suero de oveja 0.5%

Para 10 ml:

50 µL suero de oveja sin inactivar
9950 µL PBS

PBS/BSA 2%

Para 10 ml:

0.2 gr BSA
Aforar a 10 ml con PBS

Yoduro de propidio 1 µg/µL

Para 1 ml:

Pesar 1 mg de yoduro de propidio (Sigma P 5264)
Aforar a 1 ml con H₂O bidestilada

DAPI 1 µg/µL

Para 1 ml:

Pesar 1 mg de DAPI (Sigma D 9542)
Aforar a 1 ml con H₂O bidestilada

SYTOX Green 8 ng/mL

Para 4 mL:

2 µL SYTOX Green (Invitrogen S7020) 10 µM
3998 µL de PBS

3.1 Inmunocitoquímica

Material:

- PBS
- Formaldehído 3.8% o PFA 4%
- PBS/Tritón 0.5%
- PBS/Suero de oveja 0.5%
- PBS/BSA 2%
- Anti-Nur77 diluido en PBS/BSA 2%
- Anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos: Alexa Fluor 488, 594 o 647
- RNAsa 10µg/ml
- Colorantes de núcleo: SytoxGreen, yoduro de propidio o DAPI

Día 1

1. Retirar el medio de cada uno de los pozos y lavar una vez con PBS.
2. Fijar las células con 1ml de formaldehído 3.8% o PFA 4% (fresco) durante 30' a temperatura ambiente. *El uso de uno u otro fijador depende de las recomendaciones de cada colorante de organelos. En caso de no especificar alguno, ambos pueden utilizarse de manera intercambiable.
3. Aspirar y hacer 3 lavados con PBS
4. Permeabilizar con PBS/Tritón 0.5% (Biorad. 161-0407) e incubar 5' a temperatura ambiente.
5. Lavar 2 veces con PBS
6. Bloquear durante 30' con PBS/ 0.5% de suero de oveja
7. Diluir el anticuerpo primario en PBS/BSA 2% y una vez concluido el bloqueo incubar con el anticuerpo primario toda la noche (12-14 h) a 4°C en cámara húmeda

Anticuerpo	Especie hospedera	Dilución en PBS/2% BSA	Compañía
Anti-Nur77	Conejo (policlonal)	1:100	Santa Cruz (M-210)

Día 2

8. Lavar 3 veces con PBS.
9. Diluir en PBS el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo que se necesite.

Fluoróforo	Dilución	Compañía	Señal	λ (Ex – Em)
Alexa Fluor 647	1:1000	Invitrogen A31634	Rojo lejano	498 nm – 519 nm
Alexa Fluor 594	1:1000	Invitrogen A31631	Rojo	591 nm – 619 nm
Alexa Fluor 488	1:1000	Invitrogen A31628	Verde	654 nm – 668 nm

10. Incubar 30' a temperatura ambiente

11. Lavar 1 vez con PBS y después tratar las células con RNAsa (10µg/ml) durante 30' a 37°C

12. Lavar 1 vez con PBS y luego teñir núcleos con cualquiera de los siguientes colorantes:

Colorante	Concentración	Compañía	Señal	λ nm (Ex – Em)*
DAPI	100 ng/ml	Sigma D9542	Azul	358 nm - 462 nm
Sytox Green	10 ng/ml	Invitrogen (S7020)	Verde	502 nm - 524 nm
Ioduro de propidio	100 ng/ml	Sigma	Rojo	303 nm - 620 nm

13. Incubar 15' a temperatura ambiente

14. Lavar 2 veces con PBS

15. Las muestras están listas para observarse o se pueden guardar a 4°C en cámara húmeda.

3.2 Tinción de mitocondrias y aparato de Golgi

Las mitocondrias fueron teñidas con *Mitotracker Deep Red 633* (Invitrogen-Molecular Probes M22426) a una concentración 50 nM. El aparato de Golgi fue teñido con 5 µM BODIPY-TR (Invitrogen D-7540).

Material:

- Formaldehído 3.8% o PFA 4%
- *Mitotracker Deep Red 633* 100 µM
- BODIPY-TR *ceramide* 5 µM / BSA 5 µM
- Medio suplementado

Tinción de mitocondrias:

1. Diluir el *Mitotracker* 100 µM en medio HEK293 para obtener una concentración final 50 nM.
2. Retirar el medio a las células y agregar el medio suplementado/*Mitotracker* 50 nM e incubar durante 30' a 37°C y 5% CO₂.
3. Retirar el medio de los pozos y hacer un lavado con PBS.
4. Fijar a temperatura ambiente con formaldehído 4% o a 37°C con PFA 3.7% durante 30'

* Corresponde a máximos de excitación y emisión en nm.

5. Hacer 3 lavados con PBS y observar en el microscopio de fluorescencia o confocal.

Tinción de aparato de Golgi:

1. Retirar el medio de crecimiento (el suplementado) e incubar las células 30' a 4°C con 5 μ M BODIPY-TR /BSA en HEPES.
2. Lavar la muestra varias veces con medio suplementado frío e incubar 30' con medio fresco a 37°C
3. Lavar la muestras con medio fresco (37°C) y examinar las muestras con microscopía de fluorescencia o confocal. El aparato de Golgi se observa prominentemente marcado y otras membranas intracelulares se observan más débil.

4. Biología Molecular

Soluciones:

Gel de agarosa 1%

Para 12.5 ml

- Pesar 0.125 g de agarosa
- Aforar con TAE /Bromuro de etidio a 12.5 ml

TAE 10X

Para 1 L:

- 48.4 g Tris-base
- 10.9 g Ácido acético glacial
- 2.92 g EDTA

Aforar a 1 L con agua bidestilada.

TAE/Bromuro de Etidio

Para 500 ml:

- 10 ml TAE 50X
- 125 μ g Bromuro de etidio
- 490 ml H₂O

Urea 10M/ azul de bromofenol

- Urea 10 M
- Pizca de azul de bromofenol
- Alicuotar y mantener a 4°C

Acetato de sodio 3M

- Acetato de sodio 3M
- Ajustar pH a 5.2

4.1 Digestión de plásmidos para linearización.

Material:

- H₂O grado biología molecular
- Gel de agarosa 1%
- TAE /Bromuro de etidio
- Urea 10 M / Azul de bromofenol
- Marcador de peso molecular de DNA
- Endonucleasa específica
- *Buffer* de la endonucleasa

1. Para linearizar un 100 ng de plásmido mezclar en un tubo de 0.5 ml:

- 7.5 μ L de H₂O grado biología molecular.
- 100 ng de plásmido disueltos en 1 μ L de H₂O
- 1 μ L buffer específico para la enzima 10X
- 2.5 unidades de endonucleasa específica (~ 0.5 μ L)

2. Mezclar e incubar a la temperatura que indique la enzima, el tiempo necesario según la enzima. Al terminar se puede almacenar la reacción a 4°C para detener la reacción.

3. Colocar el gel de agarosa en la cámara de electroforesis y agregar TAE/Bromuro de etidio hasta cubrir el gel.

4. Tomar 4 μ L de marcador (aprox. 400 ng de DNA) de peso molecular de DNA, colocarlos sobre *parafilm*, añadir 3 μ L Urea 10M/Azul bromofenol y resuspender.

1. Para las muestras, tomar 5 μ L de la reacción de digestión, colocarlos sobre *parafilm*, añadir 2 μ L Urea 10M/Azul bromofenol y resuspender.

2. Cargar los pozos del gel de agarosa con cada una de las muestras y correr el gel a 100-150 V hasta que la línea de frente de corrida llegue casi al final del gel.

3. Visualizar el patrón de digestión con luz UV y tomar fotografía.

4.2 Mutagénesis sitio dirigida

Mediante la estrategia *Quickchange* (Stratagene 200519) se insertó el epítipo FLAG a (DYKDDDDKC) en el extremo 5' de Nur77 contenido en el plásmido pcDNA3.1⁻Nur77 - FL. Esta técnica consiste en sintetizar oligonucleótidos complementarios que contengan la inserción deseada en el centro del oligonucleótido. Estos oligonucleótidos se combinan con el DNA parental y se hace una extensión por PCR. Una vez terminada la reacción se incubaba el producto de PCR con la enzima DpnI que digiere el DNA metilado (parental). El DNA resultante se concentra y se utiliza para transformar bacterias ultra competentes.

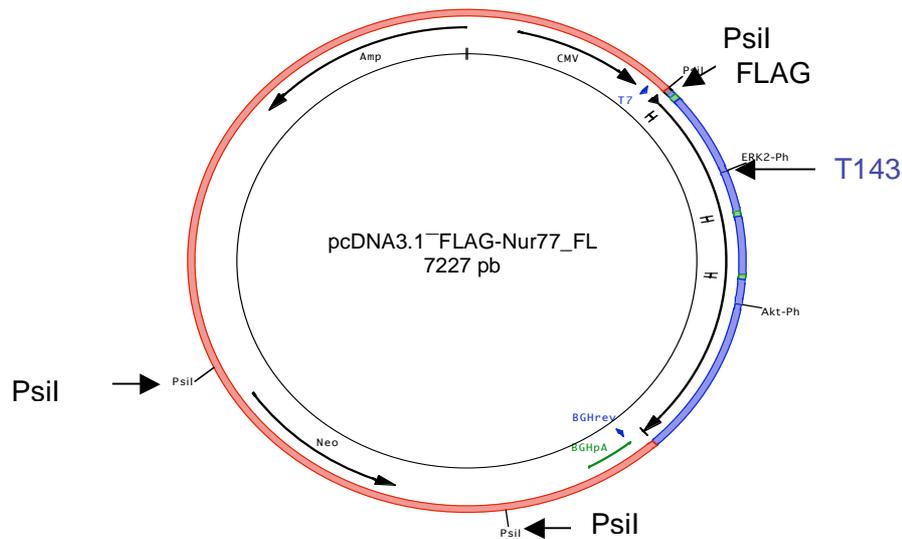


Figura 9. Inserción de la secuencia FLAG. Vector que contiene a Nur77 fusionado a FLAG.

Para generar estas mutantes se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos complementarios:

flgTR3-F:

PsiI

5'GCCCTCTAGAC GGC CGG ATG GAT TA^{*}T AAG GAT GAC GAT GAC AAG TGT ATG
CCC

NH2- M D Y K D D D D K C M

P

TGT ATC CAA GCC C3'

C I Q A -COOH

flgTR3-B:

PsiI

5'G GGC TTG GAT ACA GGG CAT ACA CTT GTC ATC GTC ATC CTT A^{*}TA ATC CAT
CCG GGC GTC TAG AGG GC 3'

Se siguió el siguiente protocolo.

Material:

- Tubos para PCR
 - Oligonucleótidos complementarios
 - DNA *templado*
 - Paquete Quickchange (Stratagene 200519)
 - H₂O grado biología molecular
 - Puntas con filtro de aerosol
1. En un tubo para PCR mezclar para una reacción:
 - 125 ng de cada oligonucleótido complementario y
 - 50 ng de DNA parental
 2. Agregar:
 - 1 µL de buffer de reacción 10X
 - 1 µL de mezcla de dNTP's
 - 3µL de solución *Quick*
 3. Aforar a 50 µL con H₂O grado biología molecular.
 4. Agregar 1µL de polimerasa pfU Ultra. *Como control negativo, mezclar en otro tubo todos los componentes anteriores pero sin pfU Ultra.
 5. Correr la reacción de PCR de acuerdo a los siguientes lineamientos:

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	1'
2	16 (mutación puntual) o 18 (inserción o delección de múltiples aminoácidos)	95°C	50''
		55°C	50''
		68°C	7' (1'/Kb de plásmido)
3	1	68°C	7'

6. Al término de la PCR, agregar 1 µL de enzima DpnI, mezclar e incubar durante 1 h a 37°C.

4.2.1 Concentración del producto de PCR tratado con DpnI

Para incrementar la eficiencia de transformación de las bacterias ultracompetentes se optimizó el protocolo concentrando el DNA producto de la PCR.

Material:

- Acetato de sodio 3M pH 5.2
 - Etanol frío
 - Etanol 70% frío
 - H₂O grado biología molecular
1. Transferir el producto de PCR tratado con la enzima DpnI a un tubo de 1.5 ml y aforar con agua grado biología molecular a 100 µL.
 2. Agregar 1/10 del volumen (10 µL) de acetato de sodio 3M pH 5.2.

3. Agregar dos volúmenes (200 μ L) de etanol absoluto frío, agitar e incubar 2' a TA.
4. Centrifugar 10' a 10,000 rpm a 4°C y decantar el sobrenadante con mucho cuidado.
5. Lavar con 500 μ L de etanol 70% frío, agitar y centrifugar 5' a 10,000 rpm a 4°C.
6. Decantar el sobrenadante y dejar los tubos destapados por 2' para secar.
7. Resuspender el botón en 5 μ L de agua grado biología molecular.

4.2.2 Transformación de las bacterias ultracompetentes

Material:

- Bacterias ultracompetentes DH5 α con eficiencia de transformación $>10^8$ ufc/ μ g de DNA
- β -mercaptoetanol
- Medio LB precalentado a 37°C
- Cajas de selección LB/Ampicilina

1. Descongelar en hielo 45 μ L de bacterias DH5 α ultra competentes
2. Agregar 2 μ L de β -Mercaptoetanol e incubar 10' en hielo, mezclando ocasionalmente.
3. Agregar 5 μ L del DNA concentrado e incubar 30' en hielo.
4. Dar un pulso de 30'' a 42°C e incubar en hielo 2'
5. Agregar 1 ml de medio LB precalentado a 37°C e incubar 1 h a 37°C en agitación
6. Platear 1 ml en cajas de selección LB e incubar a 37°C durante 12-16 h

4.3 Secuenciación de las construcciones

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos para secuenciar la integridad de los plásmidos de Nur77 después de insertar la secuencia FLAG.

Para secuenciar la parte media de Nur77 se utilizó el siguiente par de oligonucleótidos:

- **M fw:**
5' GCC TTC TTT TCC TTC AGT CC 3'
- **M rev:**
5' TGC TCC TTC AGG CAG CTG 3'

Para secuenciar el extremo 3' se utilizó el oligonucleótido:

- **BGHRRev:**
5' TGG GGC AGG ACA GCA AGG 3'

Para mandar a secuenciar una construcción mezclar en un tubo de PCR en un volumen final de 15µL:

- 625 ng de DNA
- 5 pmol del oligonucleótido

5. Western Blot

Soluciones:

Buffer de lisis

- 50 mM Tris base pH 8
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 0.05 % NP-40 (IGPAL)
- 0.25% Deoxicolato
- Añadir una pastilla inhibidora de proteasas (Roche) por cada 10 ml

Para 10 ml:

- 1 ml Tris base pH 8 0.5 M
- 58 mg NaCl
- 3.7 mg EDTA
- 5 µL IGPAL
- 2.5 mg Deoxicolato
- Añadir una pastilla inhibidora de proteasas (Roche)
- Aforar a 10 ml con agua grado de cultivo.

Solución Bradford 1:4

Para 20 mL:

- Diluir 4 mL de solución Bradford (Biorad 500-0006) 16 mL de agua bidestilada.

BSA 10 µg/µL

Para 1 mL:

- Pesar 10 mg de BSA
- Aforar a 1 mL con H₂O bidestilada
- Hacer alícuotas de 20 µL y guardar a -20°C

4x Tris.Cl/SDS, pH 6.8 (0.5 M Tris.HCl, 0.4 % SDS)

Para 100 ml:

- A 40 ml de H₂O añadir:
- 6.05 g tris base
- 0.4 g SDS
- Ajustar el pH a 6.8 con 1 N HCl
- Aforar con H₂O a 100 ml
- Filtrar con membrana de 0.45 µm y guardar a 4°C

4x Tris.Cl/SDS, pH 8.8 (1.5 M Tris.HCl, 0.4 % SDS)

Para 500 ml:

- A 300 ml de H₂O añadir:
- 91 g tris base
- 2 g SDS
- Ajustar el pH a 8.8 con 1 N HCl
- Aforar con H₂O a 500 ml
- Filtrar con membrana de 0.45 µm y guardar a 4°C

Persulfato de amonio 10%

- 100 mg de Persulfato de amonio
- 1 ml de H₂O destilada
- Almacenar en alícuotas de 100 µL a -20°C

Buffer de carga 5X-SDS

- A 3.55 ml de H₂O agregar:
 - 1.25 ml de Tris.HCl 0.5 M, pH 6.8
 - 2.5 ml de glicerol
 - 2 ml de SDS 10%
 - 200 µL de azul de bromofenol 0.5%
- Hacer alícuotas de 95 µL y almacenar a 4°C. Antes de usar, agregar 5 µL de β-Mercaptoetanol por cada 95 µL

Buffer de electroforesis 10x

- 15.1 g Tris base
- 72.0 g glicina
- 5.0 g SDS
- Aforar a 1 L

Buffer de transferencia (20 mM Tris/ 150mM glicina, pH 8)

Para 6 L:

- A 4 L de agua agregar:
 - 14.5 g Tris base
 - 67 g glicina
 - Ajustar pH a 8.0
 - Añadir
 - 1.2 L de metanol

Aforar con H₂O a 6 L

Rojo de Ponceau

- 0.1% de rojo de Ponceau
- 5% ácido acético

TBS 10X

- 24.23 g Tris
- 80.06 g NaCl

- Agregar 800 ml de H₂O destilada
- Ajustar pH a 7.6 con HCl
- Aforar a 1 L.

TBST (TBS /0.1% Tween)

- TBS 1X
- 0.1% Tween (Research Organics #3061T)

Solución reveladora

Para 250 ml:

- 50 ml de solución reveladora
- 200 ml de H₂O bidestilada

Solución fijadora:

Para 250 ml:

- 50 ml de solución fijadora (Sigma P7167-1GA)
- 200 ml de H₂O bidestilada (Sigma P7142-1GA)

5.1 Lisis de células y extracción de proteínas

Material:

- PBS frío
- *Buffer* de lisis
- Pistón de jeringa estéril
- Microcentrífuga preenfriada a 4°C
- Sonicador

1. Remover el medio del plato de cultivo, colocar el plato sobre hielo y despegar las células con el pistón de una jeringa estéril.
2. Agregar 1.5 ml de PBS frío (para plato de 10 cm), levantar las células y transferir la mezcla a un tubo 1.5 ml.
3. Centrifugar 5' a 2000 rpm a 4°C y retirar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón en 1 ml de PBS frío y centrifugar 5' a 2000 rpm a 4°C.
5. Añadir un volumen suficiente de *buffer* de lisis frío por cada botón de células. *Para un plato de 10 cm. (10⁶ células) añadir 150-200 µL de *buffer* de lisis.
6. Mezclar vigorosamente e incubar en agitación suave 15' a 4°C.
7. Colocar los tubos en hielo y sonicar con 3 ciclos de 20'' con amplitud de 35%

8. Centrifugar 10' a 10,000 g a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo preenfriado en hielo.
9. Hacer alícuotas en volúmenes suficientes que eviten la descongelación y congelación de las muestras y almacenar a -70°C no más de un mes.

5.2 Determinación de la concentración de proteínas

Material:

- Espectrofotómetro con luz visible a 595 nm
- Tubos falcon de 15 ml (Corning 430790)
- Cubetas desechables de poliestireno
- Solución Bradford 1:4
- BSA 10 µg/µL

Preparación de soluciones estándar: 0 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL y 10 µg/mL de BSA.

1. Hacer una dilución de BSA 1:10, con agua bidestilada, obteniendo una concentración de 1 µg/µL de BSA.
2. Mezclar en tubos falcon para cada solución estándar:
 - 990 µL de solución Bradford 1:4
 - 0, 2, 4, 6 u 8 µL de BSA 1 µg/µL o 1 µL BSA 10 µg/µL, respectivamente
 - x µL de *buffer* de lisis (de acuerdo a la cantidad que se use en la medición de las muestras)
 - Aforar a 1000 µL con agua bidestilada cada una de las soluciones estándar
 - Agitar y transferir a cubetas de poliestireno cada una de las soluciones.

En tubos separados, agregar para cada muestra a determinar:

- 990 µL de solución Bradford 1:4
 - x µL de muestra disuelta en *buffer* de lisis (x varía de acuerdo a la cantidad de proteína presente en la muestra)
 - Aforar a 1000 µL con agua bidestilada cada una soluciones estándar
 - Agitar y transferir a cubetas de poliestireno cada una de las soluciones
3. Medir la absorbancia de las soluciones estándar y después las muestras en el espectrofotómetro a 595 nm.

- Hacer una curva estándar con las mediciones de los estándares y determinar la concentración de las muestras usando esa curva; el resultado se obtiene en $z \mu\text{g} / x \mu\text{L}$.

5.3 SDS-PAGE electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes

Material:

- Acrilamida/Bis (Biorad 5000006)
- *Buffer* 4x Tris-HCl pH 6.8 y pH 8.8
- H₂O bi destilada
- Persulfato de amonio 10% (Biorad 161-0700)
- TEMED (Biorad 161-0800)
- 2 vasos de precipitado pequeños
- Isobutanol
- Peine para gel

Para preparar un gel 7.5% en cámara Tall Mighty Small (Hofer SE 280):

- Armar la cámara Mighty Small, poner los vasos de precipitado sobre hielo y preparar la solución concentradora y la separadora en cada vaso respectivamente, mezclar:

	Solución separadora		Solución concentradora	
Acrilamida/Bis (30%T, 2.67%)	2.5 ml		0.8125 ml	
<i>Buffer</i> 4X Tris HCl	pH 8.8	2.5 ml	pH 6.8	1.562 ml
H ₂ O	5 ml		3.8 ml	
Persulfato de amonio 10%	50 μl		31.6 μL *	
TEMED	10 μL		7 μL *	

- Tomar la solución separadora con jeringa de 10 ml y añadirla al *cassete* cuidando que no se formen burbujas y después agregar 1.5 ml de isobutanol para nivelar el gel y eliminar las burbujas.

- Una vez polimerizada la solución separadora (aproximadamente 30' después) decantar el isobutanol y lavar una vez con *Buffer* 4X Tris HCl pH 8.8.

- *Agregar el persulfato de amonio y el TEMED a la solución concentradora, mezclar, aspirar la solución con jeringa y añadirla al *cassete* y colocar el peine cuidando que no se formen burbujas.

5.3.1 Desnaturalización de las proteínas

Material:

- *Buffer* de carga 5X
- *Buffer* de electroforesis
- β -mercaptoetanol (Biorad 071-0710)
- H₂O grado biología molecular
- Puntas para cargar geles SDS-PAGE
- Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas #SMO403)

1. Agregar 5 μL de β -mercaptoetanol por cada 95 μL de *buffer* de carga 5X
2. Mezclar el *buffer* de carga 5x con 20 μg de proteína para obtener una solución 1X en un volumen final de 30 μL (aforar con *buffer* de electroforesis 1X)
3. Para el carril de marcador agregar 5 μL de marcador de peso molecular de proteínas, añadir *buffer* de carga 5X para obtener una solución 1X en un volumen final de 30 μL
4. Calentar a 95°C durante 5'.
5. Agregar el *buffer* de electroforesis a la cámara y cargar el gel con las puntas especiales.
6. Correr el gel a 150 V hasta que el colorante llegue al final.

5.3 Transferencia húmeda de proteína de un gel de acrilamida a membrana PVDF

Material:

- Membrana PVDF
 - Metanol
 - *Buffer* de transferencia frío
 - Fibras, papel filtro
 - Cámara y *cassettes* de transferencia
 - TBST/leche descremada 5%
 - TBST/BSA 4% (si se analizarán fosfo-proteínas)
1. Prehumerar la membrana PVDF (Immobilion-P IPVH00010) en metanol durante 2' y luego 1' en *buffer* de transferencia frío.
 2. Equilibrar el gel 5' en *buffer* de transferencia frío.
 3. Humedecer la esponja y el papel filtro a saturación en el *buffer* de transferencia.
 4. Armar el *cassete* de transferencia en el siguiente orden: una fibra, papel filtro, el gel, la membrana PVDF, papel filtro y una fibra. *Colocar la membrana PVDF hacia el extremo negativo y eliminar las burbujas entre el gel y la membrana.
 5. Colocar el *cassete* de transferencia en la cámara y agregar el *buffer* de transferencia, transferir a 100 V o 350 mA por 90' a temperatura ambiente ó transferir toda la noche a 15 V en cuarto frío.
 6. Al terminar la transferencia, lavar la membrana dos veces con agua destilada.
 7. Verificar la transferencia y el cargado de la proteína tiñendo la membrana con rojo de Ponceau por 5', cortar las bandas si es necesario.

- Lavar con agua destilada por 3' o hasta que el colorante desaparezca y rehumedecer la membrana con metanol.

Western Blot

- Bloquear por 4h o toda la noche con leche descremada al 5% disuelta en TBST o con TBST/BSA 4% cuando se analicen fosfoproteínas (para eliminar el fondo de la caseína, proteína presente en la leche).

- Hacer 3 lavados de 5' cada uno con TBST.

Incubación con los anticuerpos.

Material:

- Anticuerpo primario
- Anticuerpos secundarios
- TBST

- Incubar con el anticuerpo primario de acuerdo a:

Anticuerpo	Especie hospedera	Dilución en TBST	Compañía
Anti-Nur77	Conejo (policlonal)	1:400	Santa Cruz (M-210)
Anti-GAPDH	Conejo (policlonal)	1:2000	Abcam (ab9485)
Anti-FLAG	Ratón (monoclonal)	10 µg/ml	Sigma F3165 M2

- En general, incubar en agitación a temperatura ambiente durante 1 h si es anticuerpo policlonal y 2 h si es anticuerpo monoclonal; pero el tiempo de incubación de cada anticuerpo debe ser optimizado individualmente. *Después de la incubación el anticuerpo se puede recuperar y guardar a la temperatura que indica el fabricante.

- Lavar 3 veces (10' c/u) con un volumen de TBST suficiente para cubrir la membrana.

- Incubar con el anticuerpo secundario durante 45'-1 h a temperatura ambiente y en agitación.

Anticuerpo	Dilución en TBST	Compañía
IgG anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano	1:16,000	SIGMA, A0545
IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano	1:10,000	Amersham NA931V

- Lavar 4 veces (5' c/u) con TBST

5.5 Revelado

Material:

- Reactivos de detección para luminiscencia
 - Solución fijadora (Sigma P7167-1GA)
 - Películas reveladora (Sigma P7142-1GA)
 - *Cassete* de revelado
 - Plástico *Saranwrap*
 - Recipiente cuadrangular de plástico
1. Mezclar en el recipiente de plástico los reactivos de detección para luminiscencia (ECL Amersham Biosciences RPN2106) en proporción 1:1.
 2. Sumergir la membrana en la mezcla durante 1' y después secar con papel el exceso de reactivo.
 3. Recubrir la membrana con plástico y acomodar la película sobre la membrana marcando los pesos moleculares con puntos fluorescentes.
 4. Cerrar el casete y dejar exponer inicialmente durante 1' y dependiendo de la intensidad de esta exposición variar las siguientes exposiciones.
 5. Sumergir la película expuesta en la solución reveladora durante 1' y enjuagar.
 6. Sumergir la película en el fijador durante 1', enjuagar, secar.

6. Interferencia de RNA

El siRNA fue sintetizado con el paquete de construcción de siRNA *Silencer* (Ambion #1620). Brevemente, para diseñar los siRNA se buscaron probables regiones blanco del RNA mensajero de Nur77 que cumplieran con las siguientes características:

1. Secuencias de 21 nucleótidos iniciada por 3'AA
2. Contenido nucleotídico de GC en la secuencia del 30-53%
3. No poseer más de 16 nucleótidos contiguos de homología con cualquier otra secuencia de otro mRNA
4. Tener un valor termodinámico $\Delta G < 0.2$ (kcal/mol)

Las secuencias de los blancos del siRNA de Nur77 (NCBI: NM173158) fueron analizadas y filtradas utilizando el software del *Whitehead Institute* (Massachusetts Institute of Technology, EUA) En: <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>. Se sintetizaron cuatro pares de siRNA de 29 nucleótidos (los primeros 21 de éstos codifican el siRNA y los 8 nucleótidos

restantes son complementarios al promotor T7). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Nucleótidos: 817-839

TR3-1-sentido : 5' AAC GCU UCA UGC CAG CAU UAU CCT GTC TC 3'

TR3-1-antisentido: 5' AAA UAA UGC UGG CAU GAA GCG CCT GTC TC 3'

Nucleótidos: 1141-1163

TR3-2-sentido 5' AAA CUG GAC UAC UCC AAG UUC CCT GTC TC 3'

TR3-2-antisentido 5' AAG AAC UUG GAG UAG UCC AGU CCT GTC TC 3'

Nucleótidos: 1142-1164

TR3-3-sense 5' AAC UGG ACU ACU CCA AGU UCC CCT GTC TC 3'

TR3-3-anti 5' AAG GAA CUU GGA GUA GUC CAG CCT GTC TC 3'

Nucleótidos: 1000-1022

TR3-4-sense 5' AAG GAA GUU GUC CGA ACA GAC CCT GTC TC 3'

TR3-4-anti 5' AAG UCU GUU CGG ACA ACU UCC CCT GTC TC 3'

Después, en reacciones separadas 2 oligonucleótidos molde (“templados”) se hibridan con el *primer* del promotor T7. Los extremos 3' de los oligonucleótidos hibridados de DNA se extienden con el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa para crear una doble cadena de “templados” de transcripción de siRNA. Los “templados” antisentido y sentido del siRNA se transcriben con la RNA polimerasa T7 y los transcritos de RNA resultante se hibridan para crear un RNA de doble cadena, que consiste en una secuencia 5' líder de cadena sencilla, 19 nucleótidos de RNA doble cadena específico del blanco y hacia el extremo 3' UU terminales. La secuencia líder se remueve al digerir el RNA con una ribonucleasa específica para cadena sencilla. Por otra parte, los oligonucleótidos UU permanecen en el siRNA. El siRNA resultante se purifica en un filtro de fibra de vidrio y la elusión remueve el exceso de nucleótidos, oligómeros cortos, proteínas y sales de la reacción.

Material:

- Puntas con filtro de aerosol
- Solución de 0.1% SDS para limpiar mesa de trabajo y pipetas
- H2O DEPC
- Oligonucleótidos
- Paquete siRNA *Silencer* (Ambion #1620)

1. Preparar 25 μL de oligonucleótidos a una concentración final 100 μM^* en H2O DEPC.

* Para obtener la concentración molar dividir la concentración del oligonucleótido ($\mu\text{g}/\text{ml}$) entre 9.7; (aproximadamente en 1 μg de oligonucleótidos de 29 bases hay 9.7 moles)

2. Descongelar a TA y dar un pulso en el *vortex* a:

- T7 Promoter Primer
- Buffer de reacción Klenow 10X
- Mezcla de dNTP's 10X
- H₂O DEPC

2. Hibridación de los oligonucleótidos con el promotor de T7

Añadir a dos tubos respectivamente, cada una de las siguientes soluciones:

- 2 µL T7 Promoter Primer
- 6 µL Buffer de hibridación de DNA
- 2 µL oligonucleótido *sentido* o *antisentido*, respectivamente

3. Incubar a 70°C por 5' y luego dejar a temperatura ambiente por 5'

3. Llenado con la DNA polimerasa Klenow

Añadir a cada tubo:

- 2 µL Buffer de reacción Klenow 10X
- 2 µL Mezcla de NTP's 10X
- 4 µL DEPC H₂O
- 2 µL Polimerasa Exo-Klenow

4. Resuspender con pipeta o dar un pulso corto en el *vortex* y centrifugar brevemente para bajar todo el líquido al tubo.

5. Colocar los tubos en un bote especial para trabajo de RNA e incubar 30' a 37° C en incubadora. *El protocolo se puede detener aquí y los tubos se pueden guardar a -20 °C

4. Síntesis del RNA doble cadena.

6. Descongelar a temperatura ambiente:

- Mezcla de NTP 2X
- T7 Reacción Buffer 10X

7. Centrifugar tubos brevemente

8. Mezclar en dos nuevos tubos:

- 2 µL siRNA sentido o 2 µL siRNA antisentido (obtenidos en el paso 5)
- 4 µL DEPC H₂O
- 10 µL Mezcla de NTP 2X
- 2 µL Buffer de reacción T7 10X
- 2 µL Mezcla de enzima T7

9. Mezclar y centrifugar brevemente e incubar 2 h a 37°C (en el bote para RNA)
10. Combinar ambas reacciones (la de siRNA sentido y la del siRNA antisentido) en un tubo e incubar toda la noche a 37°C.
5. Preparación y purificación del siRNA, digestión del siRNA con RNAsa y DNAsa
 1. Poner a 75°C un bloque térmico.
 2. Descongelar a TA el buffer de digestión.
 3. Añadir al tubo que estuvo en incubación toda la noche:
 - 6 µL de buffer de digestión
 - 48.5 µL DEPC H₂O
 - 3 µL RNasa
 - 2.5 µL DNasa
 4. Mezclar e incubar 2 h a 37°C.
 5. Añadir 400 µL de buffer de unión de siRNA e incubar 3' a temperatura ambiente.
 6. Calentar DEPC H₂O a 75°C
 7. Para cada preparación de siRNA poner un cartucho con filtro en un tubo de 2 ml y mojar el cartucho con filtro con 100 µL de buffer de lavado. Añadir el siRNA al cartucho con filtro previamente mojado.
 8. Centrifugar 1' a 10,000 rpm y eliminar el eluido del tubo colector.
 9. Poner el cartucho con filtro en el tubo de 2 ml y añadir 500 µL de buffer de lavado al filtro del cartucho, centrifugar a 10,000 rpm durante 1'.
 10. Eliminar el eluido y poner el cartucho con filtro en el tubo de 2 ml.
 11. Repetir el lavado con 500 µL buffer de lavado de siRNA y transferir el cartucho con filtro a un nuevo tubo de 2 ml.
 12. Añadir 100 µL de DEPC H₂O al cartucho con filtro e incubar por 2'.
 13. Centrifugar el filtro a 12,000 rpm por 2'.
 14. Almacenar el siRNA a -20°C o -80°C

6. 2 Cuantificación de siRNA

- Diluir el siRNA 1:25 en TE o H₂O DEPC
- Leer absorbancia a 260 nm
- Multiplicar la absorbancia por 1000* para obtener µg/ml
- Dividir entre 14* para obtener la concentración µM
- Observar la producción del siRNA en gel de agarosa 2%

7. Análisis en microscopía confocal y procesamiento de imágenes.

Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal Axiovert 200M (Carl Zeiss) utilizando objetivos 40X, 63X y 100X. El procesamiento de las imágenes fue realizado con los paquetes informáticos ImageJ 1.32j (Institutos Nacionales de Salud, EUA) y Adobe Photoshop Cs[®] (Adobe Systems Incorporated, EUA)

* 25 es el factor de dilución x 40 µg siRNA/ml por unidad de absorbancia 260 nm
* Hay 14 µg de RNA en 1 nmol de RNA (de 21 oligonucleótidos) de doble cadena

VII. RESULTADOS

1. Obtención de plásmidos

Se purificaron plásmidos con calidad de transfección que fueron utilizados a lo largo del proyecto para: reproducir la muerte no apoptótica e inducir la expresión de Nur77 (pcDNA3.1⁻NK₁R), determinar la distribución subcelular de Nur77 (Nur77::GFP, Nur77- Δ DBD-GFP, Nur77- Δ 152-GFP), teñir diferencialmente endosomas (pYFP-Endo) o el retículo endoplásmico (pECFP-RE). Otros plásmidos fueron utilizados como controles negativos: (vector vacío pcDNA3.1⁻) o como controles positivos: (pQBI25-GFP, pcDNA3.1⁻SETA-FLAG). A continuación se presenta una tabla con cada uno de los plásmidos y su descripción.

Plásmido	Codifica para:
• pQBI25-GFP	Proteína verde fluorescente bajo el promotor constitutivo CMV
• pcDNA3.1 ⁻ NK ₁ R	Receptor de neuroquinina 1
• pN2-Nur77::GFP	Nur77 fusionado a GFP
• pcDNA3.1 ⁻ -FLAG-TR3-fl	Nur77 fusionado a la secuencia FLAG
• Nur77- Δ DBD-GFP	Mutante de Nur77 que carece del dominio de unión a DNA; tiene localización citoplásmica y está fusionada a GFP.
• Nur77- Δ 152-GFP	Mutante de Nur77 que carece del sitio de transactivación y tiene una localización nuclear y está fusionada a GFP.
• pYFP-Endo	Proteína marcadora de endosomas, GTPasa Rho-B fusionada a la proteína amarilla fluorescente. (BD Biosciences #6936-1)
• pECFP-RE	Proteína marcadora de retículo endoplásmico, calreticulina fusionada a la proteína cian fluorescente. (BD Biosciences #6907-1)
• pcDNA3.1 ⁻	Vector vacío
• pcDNA3.1 ⁻ FLAG-SETA	Proteína SETA fusionada a FLAG. Se utilizó como control positivo de la presencia de FLAG en nuestras construcciones.

2. Estandarización de las condiciones de transfección de la línea HEK293

El modelo de MCP inducida por SP/NK₁R puede reproducirse en células de la línea HEK293 que expresan el receptor NK₁. Debido a que gran parte del proyecto consistió en trabajo de cultivo celular y de transfección de plásmidos para reproducir el modelo de muerte o para inducir la expresión de Nur77, primeramente fue necesario estandarizar las condiciones de transfección en las células HEK293 utilizando el método de CaCl₂. En la **figura 10** se muestran células HEK293 transfectadas con Nur77::GFP y núcleos teñidos con DAPI. La eficiencia de transfección fue mayor del 80%.

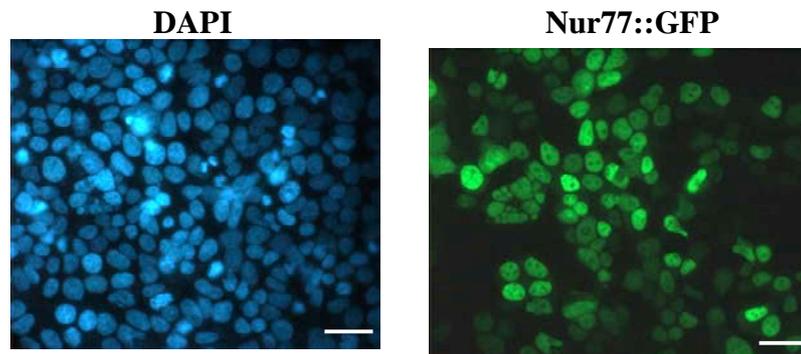


Figura 10. Eficiencia de la transfección mayor del 80%. Células HEK293 transfectadas con el plásmido Nur77::GFP. Barra de escala 30 μ m.

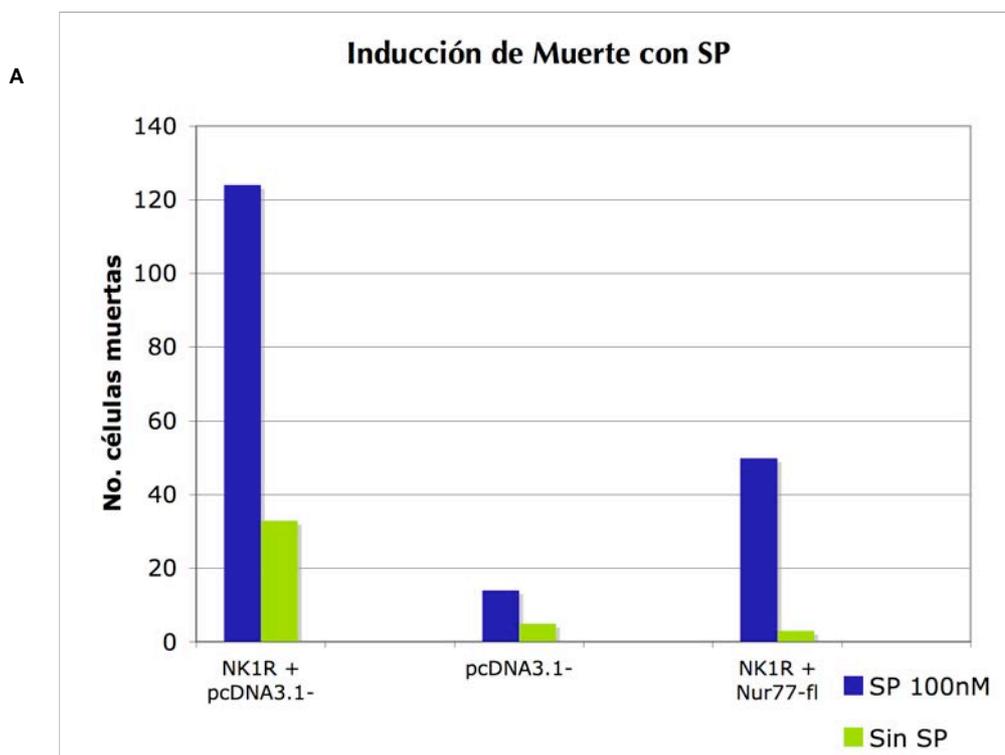
3. Reproducción del modelo de muerte celular programa no apoptótica

La MCP no apoptótica inducida por SP descrita originalmente en neuronas, puede reproducirse en células no neuronales, como las HEK293 que expresen el receptor NK₁. Por lo tanto, para estudiar la localización de Nur77 en este modelo de muerte, primeramente fue necesario reproducirlo de acuerdo a lo reportado. Se realizaron transfecciones transitorias del vector de expresión del receptor NK₁ o del vector vacío pcDNA3.1⁺; las células se incubaron 24 h con o sin SP y la muerte celular fue evaluada por el método de exclusión de azul tripano.

De manera general, en todos los pozos que se incubaron con SP se observan más células muertas en comparación con los que no se incubaron con SP. Se contaron, en promedio, 3.7 veces más células muertas en los pozos transfectados con NK₁R e incubados con SP que en los pozos que no fueron incubados con SP (primer bloque **figura 11**).

Por otro lado, si comparamos el número de células muertas de los pozos transfectados con el receptor NK_1 y que fueron incubados con SP contra las que fueron transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1 e incubadas con SP, la diferencia es de 8.8 veces (segundo bloque **figura 11**). Esto demuestra que la vía de muerte iniciada por SP necesita del receptor NK_1 para la progresión de la muerte.

Por otra parte, para determinar la localización de Nur77, consideramos como estrategia experimental inicial sobre-expresar una proteína de fusión de Nur77::GFP. Por lo tanto, fue importante evaluar si la muerte inducida por SP se altera por la sobreexpresión de Nur77. Se realizaron co-transfecciones de NK_1R y Nur77 y se evaluó la muerte celular con o sin SP. Interesantemente, contrario a lo que se esperaba, la sobreexpresión de Nur77 protegió en cierto grado la muerte inducida por SP ya que las células transfectadas con Nur77 y NK_1R expuestas a SP, se contaron 2.48 veces menos células muertas que en los pozos que sólo expresaban NK_1R . Pero además, la sobreexpresión de Nur77 también redujo el número de células muertas en 11 veces en las células que no fueron incubadas con SP en comparación con las que sólo fueron transfectadas con NK_1R y no incubadas con SP, mostrando que Nur77 protege de la muerte en general.



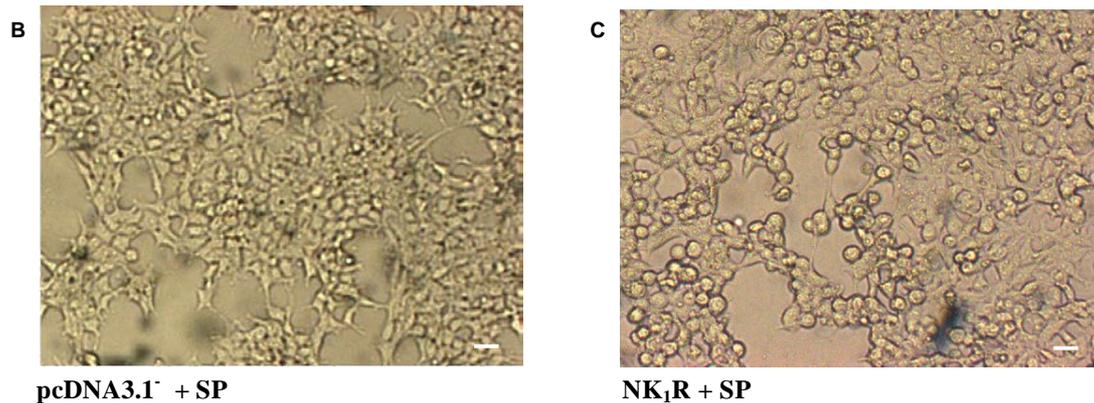


Figura 11. SP induce MCP y la sobreexpresión de Nur77 disminuye la muerte inducida por SP. A) Cuantificación de células muertas. B) Morfología de células transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1⁺ en presencia de SP, se observa morfología normal. C) Morfología de células transfectadas con NK₁R e incubadas con SP, se observa el redondeo de las células muertas. Barra de escala 30 µm. *Las manchas oscuras del fondo se deben suciedad en el objetivo.

4. Evaluación de la localización nuclear vs. citoplásmica de Nur77::GFP

Nur77 funciona a través de distintos mecanismos, ya sea en el núcleo como factor de transcripción o en el citoplasma como inductor de apoptosis. Por otra parte, la mutante Nur77-Δ152, de localización exclusivamente nuclear, que bloquea la MCP no apoptótica abrió la posibilidad de considerar que Nur77 podría estar actuando en el citoplasma; además de que Nur77 se fosforila durante la muerte y en otros sistemas se ha observado que Nur77 hiper fosforilado se localiza en el citoplasma. En observaciones iniciales de la distribución de Nur77::GFP una porción de éste se observó alrededor del núcleo. Por lo tanto, para determinar si durante la MCP no apoptótica Nur77 actuaba en el núcleo o en el citoplasma se analizó la distribución de Nur77::GFP en tiempos cortos¹: 0', 5', 15' y 30' después de inducir muerte con SP. Como se observa en la **figura 12**, en la mayoría de las células del campo, Nur77::GFP no se exporta del núcleo en los primeros 30'. Así mismo, Nur77::GFP se observa citoplásmico en las células que han perdido la membrana nuclear, es decir, las que tienen núcleos mitóticos o en las que Nur77::GFP se encuentra sobre expresado (**Figura 12.F**).

Por otro lado, la eficiencia de la transfección y las cantidades de DNA transfectadas fueron homogéneas para cada una de las condiciones; sin embargo, como se observa en la **figura 12 AEB, C y D** la señal de Nur77::GFP se observa más intensa conforme aumenta el tiempo de exposición con SP, indicando que quizá en respuesta a SP se estabiliza Nur77.

¹ Considerando que la cinética de exportación de Nur77 ocurría en tiempos cortos después de agregar SP.

Por otra parte se sabe que en cultivos celulares ocurre apoptosis espontánea en algunas células; por lo tanto, la presencia de núcleos apoptóticos en todos los campos de la **figura 12** muestra que éstas células pueden morir por apoptosis, sugiriendo que la MCP no apoptótica no ocurre como consecuencia de la inactividad o bloqueo de la apoptosis.

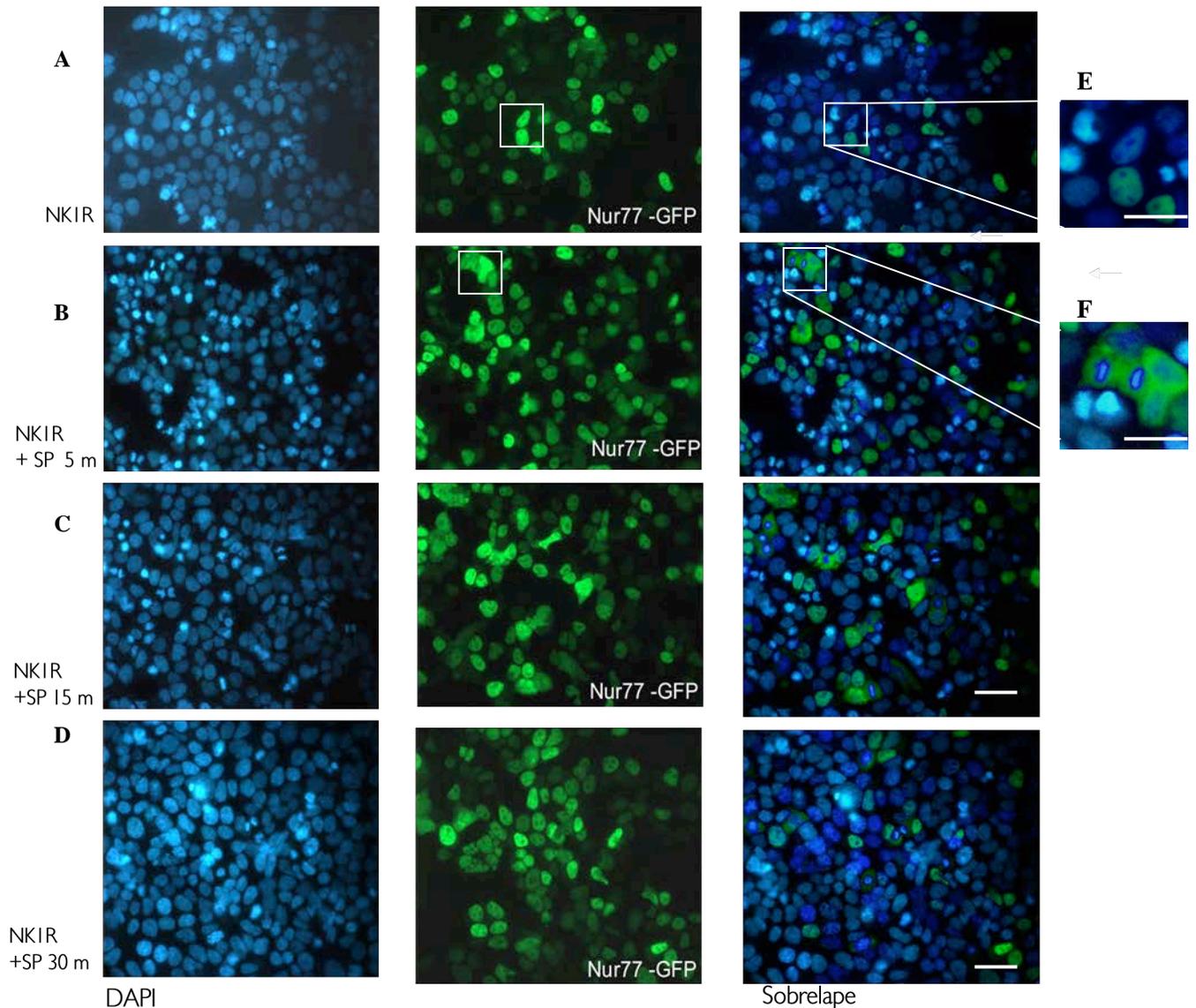


Figura 12. Cinética de la distribución de Nur77::GFP durante la inducción de muerte. (A) sin SP (B) con SP durante 5', (C) con SP durante 15'y (D) 30'. Nótese la localización nuclear de Nur77::GFP. E) Acercamiento de un sobrelape de Nur77::GFP y núcleos, Nur77 se observa totalmente nuclear. Se observan también algunos núcleos condensados F). Acercamiento de sobrelape muestra núcleos mitóticos y Nur77::GFP alrededor de ellos. A la izquierda se observan núcleos apoptóticos, a la derecha se observa Nur77::GFP en el citoplasma de células que sobreexpresaron Nur77::GFP. Imágenes observadas en microscopía de fluorescencia. Barra de escala 50 μ m.

5. Nur77::GFP no co-localiza con las mitocondrias ni con el complejo de Golgi.

En respuesta a estímulos apoptóticos, Nur77 se transloca del núcleo a la mitocondria e induce la liberación de citocromo *c* y apoptosis. Era de esperarse que en la MCP no apoptótica, Nur77 no se translocara a la mitocondria; por lo tanto, para determinar si era el caso, se realizaron transfecciones transitorias de Nur77::GFP y NK₁R y las células se incubaron con el marcador de mitocondrias *Mitotracker*, un colorante fluorescente que se difunde pasivamente por la membrana plasmática y se acumula en las mitocondrias activas. Como se observa en la **figura 13**, Nur77::GFP se encuentra en el núcleo en la mayoría de las células y no se transloca al citoplasma en los primeros 30 minutos después de inducir muerte celular con SP. Sin embargo, en aproximadamente el 11% de las células que expresan Nur77::GFP y que fueron expuestas a SP 15' y 30', éste se observa en el citoplasma pero no co-localizó con las mitocondrias.

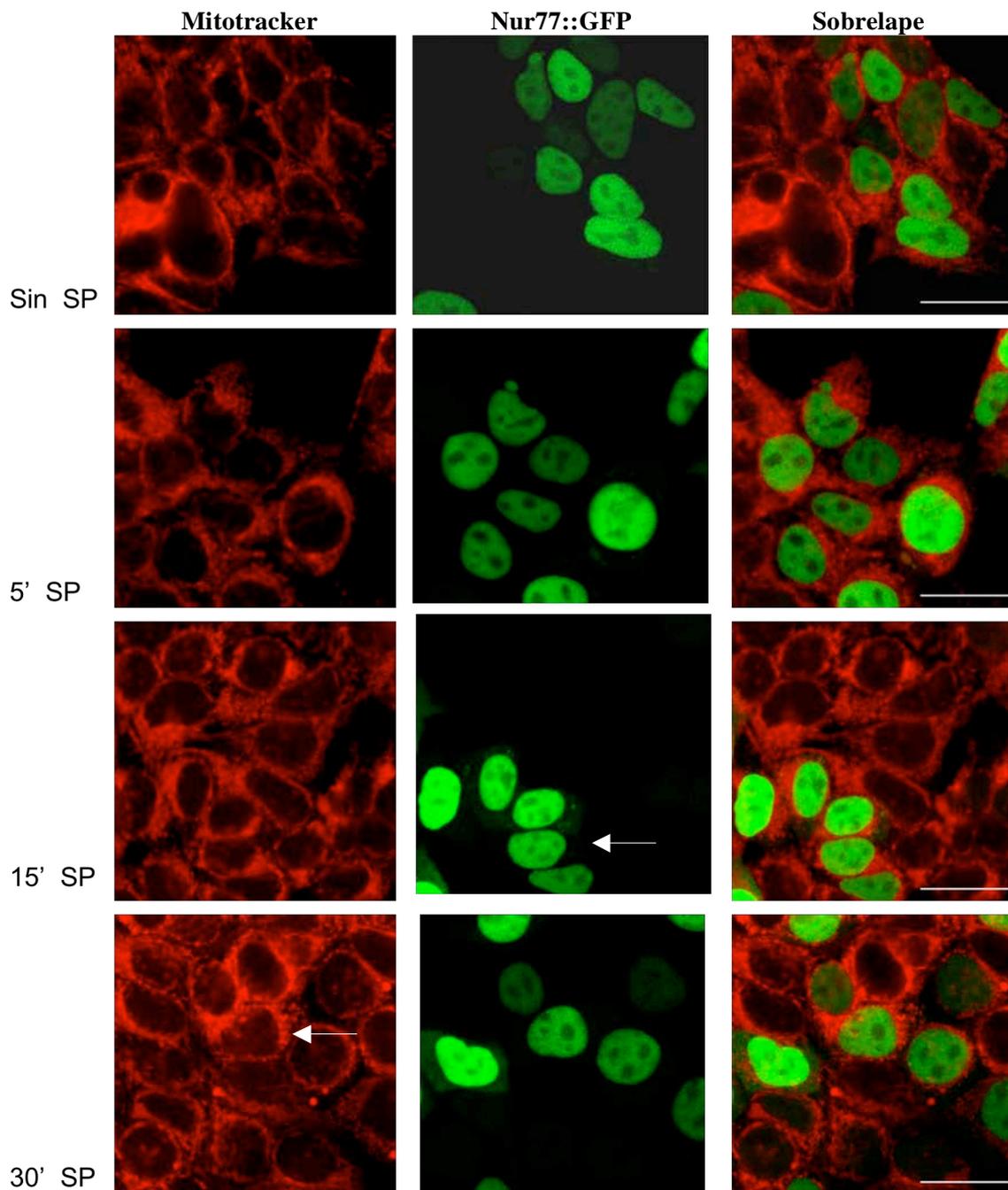


Figura 13. Nur77::GFP no se transloca a la mitocondria. Nur77::GFP se observa en el citoplasma del 11% de las células que expresan Nur77. Sin embargo, Nur77 no se transloca a la mitocondria. La flecha a los 15' indica una célula representativa donde se observa Nur77::GFP citoplásmico. Por otro lado, la flecha a los 30' indica mitocondrias en rojo teñidas con *Mitotracker*. Visualizado con microscopía confocal. Barra de escala 30 μ m.

Por otra parte, el complejo de la PI3 cinasa clase III, necesario para la expansión de membranas de aislamientos y para la progresión de la autofagia, se localiza en las cisternas *trans* del aparato de Golgi donde estaría actuando como efector de la muerte celular no apoptótica. Como Nur77 está implicado en un mecanismo de MCP que presenta características de muerte autofágica, existía la posibilidad de que en caso de que Nur77 se exporte del núcleo al citoplasma, Nur77 podría dirigirse al aparato de Golgi. Por lo tanto, para determinar si Nur77 se dirige al aparato de Golgi, se realizaron transfecciones transitorias del receptor NK₁ y de Nur77::GFP, las células se incubaron con BODIPY-TR, un análogo fluorescente de ceramida que tiñe principalmente membranas del Golgi, se indujo muerte con SP y se fijaron las células a 0', 15' y 30' después de añadir SP. Como se observa en la **figura 14**, en este experimento no se observó Nur77::GFP en el citoplasma. Por lo tanto, debido a la discrepancia con el caso anterior donde Nur77::GFP se observó en el 11% de las células, y tomando en cuenta que la sobreexpresión de Nur77 disminuye la muerte celular, procedimos a buscar la señal endógena de Nur77.

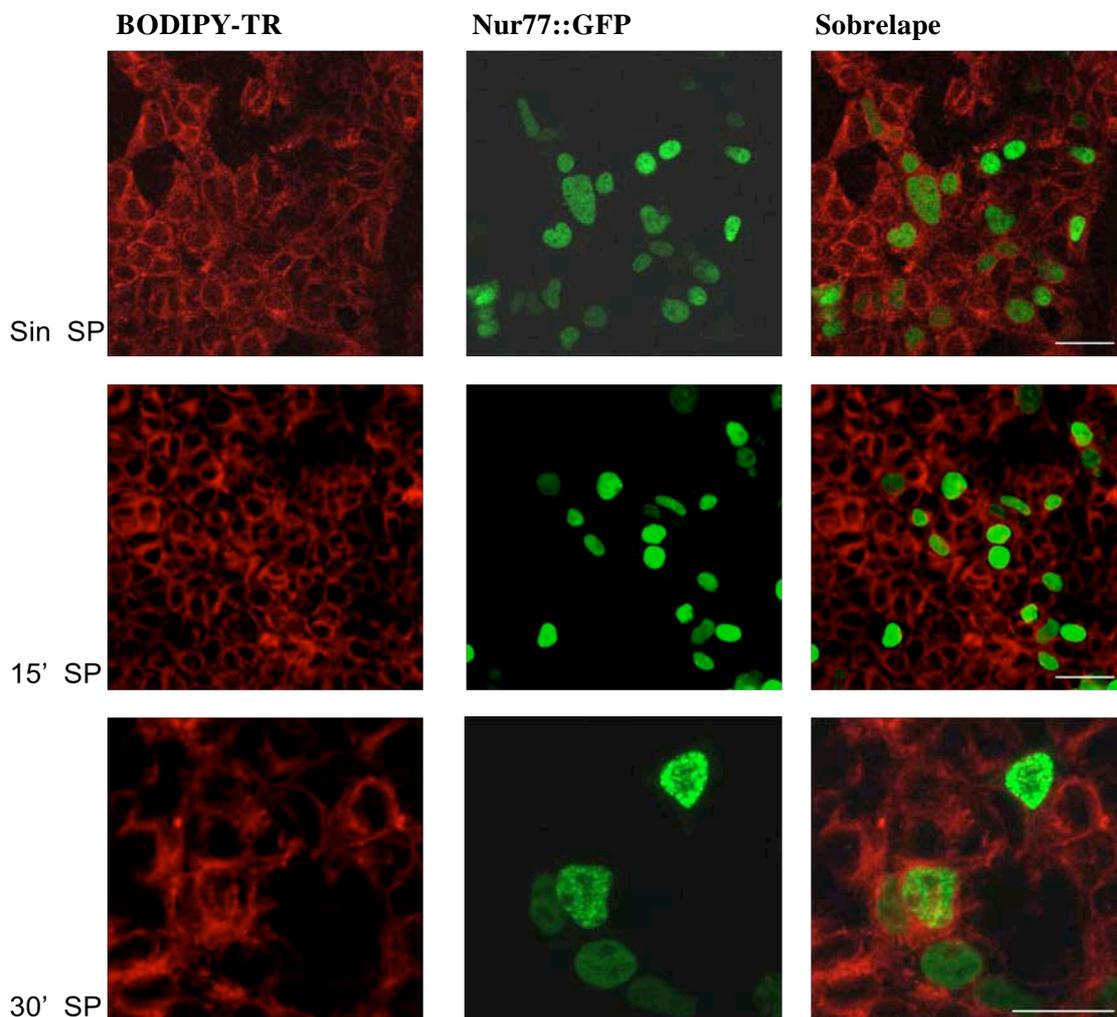


Figura 14. Nur77 no se dirige al aparato de Golgi. El aparato de Golgi está teñido con BODIPY-TR y se observa en rojo. Nur77::GFP no se transloca al citoplasma y por lo tanto tampoco al aparato de Golgi después de inducir muerte con SP. La barra representa 30 μ m.

6. Nur77 endógeno tiene una localización principalmente nuclear durante la MCP inducida por NK₁R/SP

Previamente había sido reportado por análisis de *western blot* que el máximo de inducción de Nur77 se registra a las tres horas después de inducir muerte con SP (Castro-Obregón *et al.* 2004). Para poder detectar a Nur77 *in situ* y para excluir el efecto de la sobreexpresión de Nur77::GFP se procedió a buscar la señal endógena mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-Nur77. Las células se transfectaron con NK₁R e incubadas con SP por 5', 30', 3h y 6h², y los núcleos se tiñeron con SytoxGreen. Como se observa en la **figura 15.A**, la expresión de Nur77 se empieza a inducir a partir de los 30 minutos y se observa un máximo de expresión a las 3 horas después de inducir muerte con SP. En la mayoría de las células claramente se observa la localización nuclear de Nur77 a los 30', 3 h y 6 h después de la adición de SP. Sin embargo, en algunas células se observa Nur77 tanto nuclear como perinuclear (**figura 15.B**), por lo que se procedió a determinar en qué porcentaje de las células que expresaron Nur77 éste se encontraba alrededor del núcleo. Aproximadamente 500 células (de diferentes campos y repeticiones) fueron contadas y se encontró que en el 86% de las células que expresan Nur77, éste se encuentra totalmente en el núcleo mientras que en el restante 14%, Nur77 endógeno se observa nuclear y perinuclear (aún en núcleos íntegros) (**figura 16**).

² Se escogieron los tiempos 5' y 30' para estudiar la dinámica temprana de Nur77, la evaluación a 3h fue para observar Nur77 al tiempo máximo de expresión según estaba reportado y 6 h para comparar su localización con otros experimentos del laboratorio.

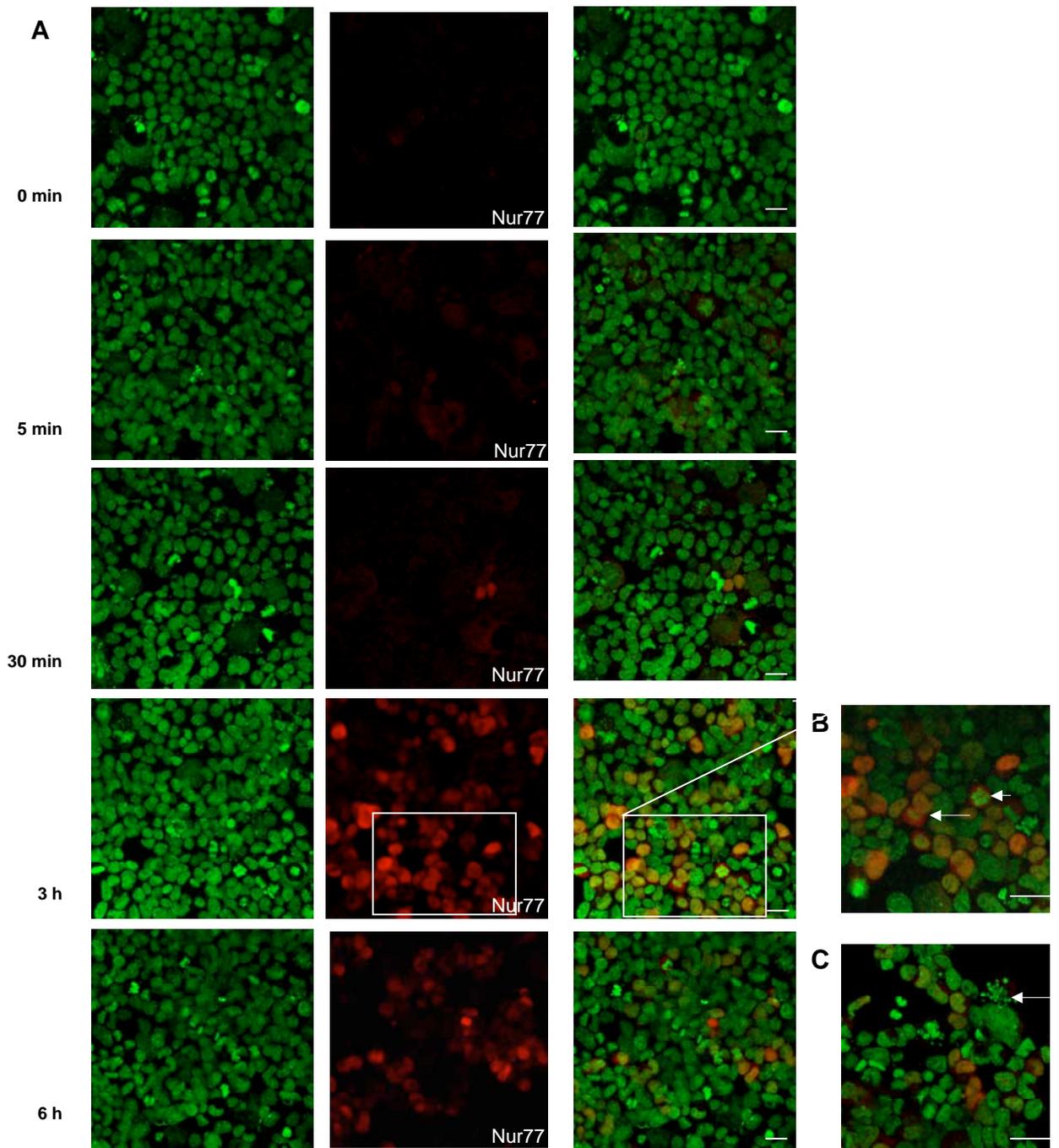


Figura 15. Localización nuclear de Nur77 endógeno. A) Inmunocitoquímica de Nur77 endógeno, se observa mayor inducción de éste a las 3 h después de su inducción con SP. B) Aumento de campo a las 3h, la flecha larga señala una célula con Nur77 nuclear y perinuclear y la flecha corta señala una célula apoptótica con Nur77 citoplásmico. C) Muestran las células en aumento a 6h. La flecha indica una célula apoptótica. La barra representa 30 μ m.

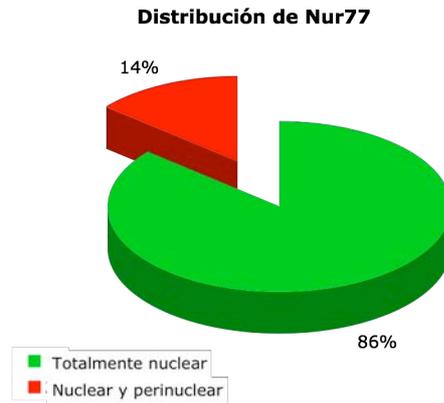


Figura 16. Distribución de Nur77. En el 86% de las células que expresaron Nur77 éste se observa totalmente nuclear mientras que en el restante de las células Nur77 se observa nuclear y citoplásmico (aun en núcleos íntegros).

Además, para asegurarnos que la señal de Nur77 era resultado específico de su inducción por SP/NK₁R, las células se transfectaron con el vector vacío pcDNA3.1⁻ y se incubaron con SP por 5', 30', 3h y 6h, respectivamente. En dichos pozos no se observó señal del fluoróforo acoplado al anticuerpo secundario (**Figura 17.A**), mostrando así que la expresión de Nur77 es inducida por la vía de NK₁R. Por otra parte, para descartar que la señal que observamos fuera resultado de inespecificidad del anticuerpo secundario, en dos pozos que fueron transfectados con NK₁R y pcDNA3.1⁻ e incubados por 3h con SP respectivamente, no fueron incubados con el anticuerpo primario anti-Nur77 y solamente con el anticuerpo secundario anti-IgG conejo acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 647; en estos pozos no se observó señal alguna del anticuerpo secundario (**Figura 17.B**).

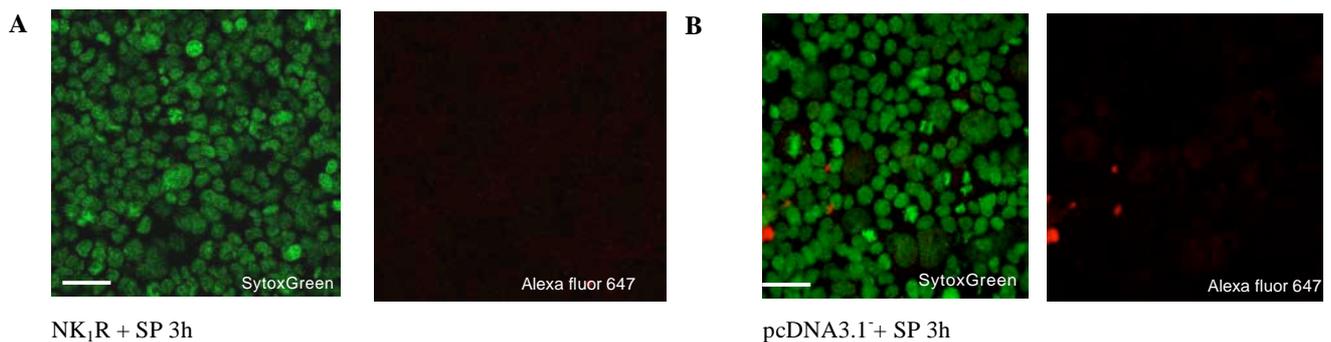
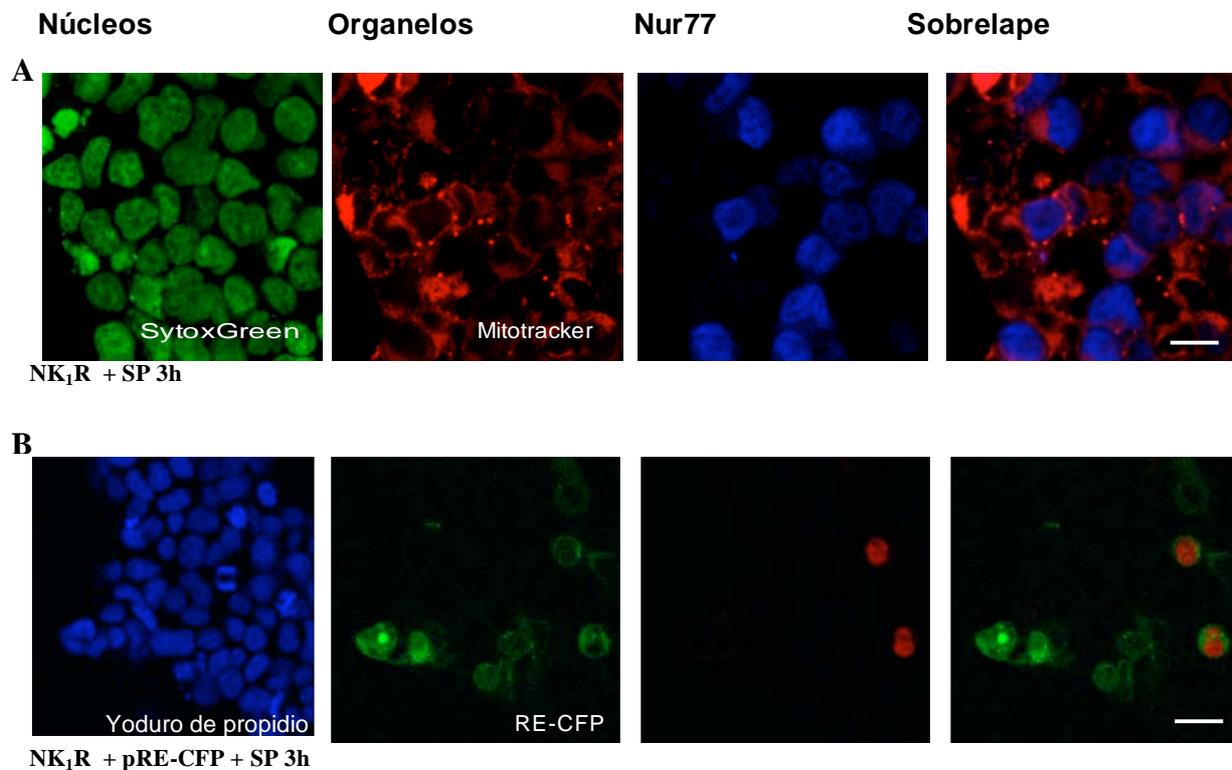


Figura 17 . Especificidad de la señal. **A)** Células HEK 293 transfectadas con NK₁R o **B)** vector vacío e incubadas con SP 3h. La inmunocitoquímica fue realizada como se describe en los métodos pero en **A** en ausencia de anticuerpo primario. Los núcleos fueron teñidos con SytoxGreen y se observan en verde. Los puntos rojos son señal inespecífica. Barra de escala 50 μm.

7. Nur77 no co-localiza con las mitocondrias, el retículo endoplásmico ni con los endosomas

Para determinar si la pequeña porción de Nur77 endógeno que se observó fuera del núcleo se dirigía a la mitocondria o RE, se tiñeron estos organelos diferencialmente e independientemente. Por un lado, las células se transfectaron con el NK₁R, se incubaron durante 3h con SP, las mitocondrias fueron teñidas con *Mitotracker* y los núcleos con *SytoxGreen*. Por otro lado, para el caso del RE, se transfectó NK₁R y el marcador de endosomas pRE-CFP, las células se incubaron con SP durante 3h y los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio. Como anteriormente se mencionó, Nur77 puede mediar la liberación de citocromo *c* al translocarse a la mitocondria e inducir apoptosis. Por otro lado, también se sabe que en respuesta a estímulos apoptóticos³ Nur77 se transloca al RE donde interactúa con Bcl-2 e inicia la liberación de Ca⁺⁺ (desde el RE) generando así estrés en el RE e inducción de apoptosis a través de la activación de caspasas -4 y -9 (Liang *et al.* 2007). Por lo tanto, era probable que durante la MCP inducida por SP/NK₁R, Nur77 no se translocara a ninguno de estos dos organelos. En efecto, como se observa en la **figura 18**, Nur77 no co-localizó con las mitocondrias (**figura 18.A**) ni en el retículo endoplásmico (**figura 18.B**).



³ AHPN/CD437

Figura 18. Nur77 no co-localiza con la mitocondrias ni con el retículo endoplásmico. A) Las mitocondrias están teñidas con *Mitotracker*. B) El RE se observa en verde. La barra representa 30 μm .

Por otra parte, se sabe que ERK2 es necesaria para la progresión de la MCP no apoptótica y además, también se sabe que durante este tipo de muerte, ERK2 fosforilada activa se asocia con el complejo de arrestina 2, localizado en los endosomas. Por lo tanto, debido a que Nur77 se fosforila durante la MCP y a que Nur77 puede ser fosforilado *in vitro* por ERK2, consideramos la posibilidad de que Nur77 interactuara directamente con ERK2. Por lo anterior, consideramos que Nur77 exportado se dirigía a los endosomas para ser fosforilado por ERK2 durante la MCP inducida por SP/NK₁R. Para determinar esto, se realizaron transfecciones del receptor NK₁ y de la proteína marcadora de endosomas RhoB::YFP, las células se incubaron durante 3h con SP y los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio. Contrario a lo que consideramos, como se observa en la **figura 19**, Nur77 endógeno no se translocó a los endosomas.

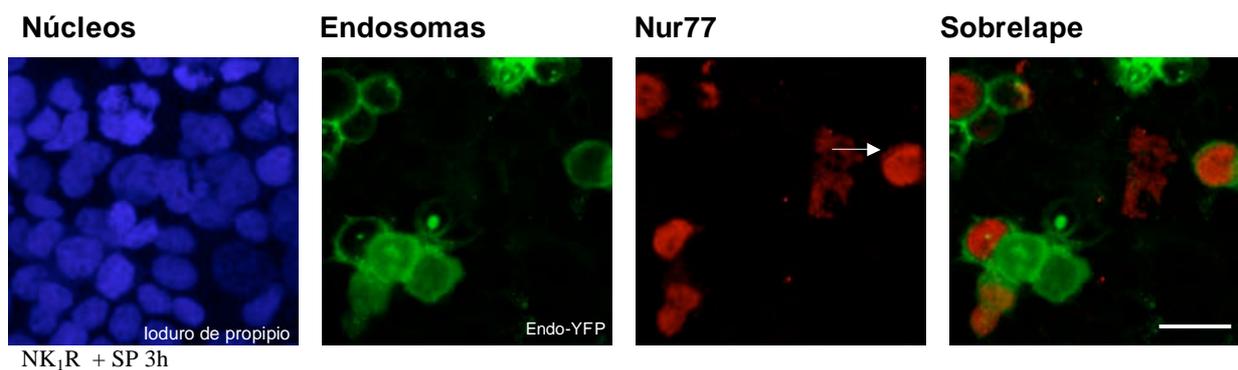


Figura 19. Nur77 no co-localiza con los endosomas. Las células se transfectaron con NK₁R y el marcador de endosomas RhoB::YFP y se incubaron 3 h con SP. La flecha señala una célula donde se observa Nur77 en el citoplasma y este no co-localizó con los endosomas. Barra de escala 30 μm .

Por otro lado, el marcador de endosomas se observa definida y nítidamente en la membrana plasmática cuando no hay estímulos que inducen la internalización de endosomas; y de manera contraria, cuando hay actividad endocítica, la señal del marcador se puede observar en el citoplasma y de manera más difusa.

A pesar de que la internalización del receptor requiere de endocitosis y de que la cascada de fosforilaciones antes descrita se localiza en los endosomas, no se observó una diferencia significativa en la distribución de los endosomas (**figura 20**) de las células que fueron transfectadas con NK₁R en comparación con las células control que fueron transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1⁻. Posiblemente esto se deba al tiempo en que se observó 3h, pues la endocitosis sucede durante los primeros minutos.

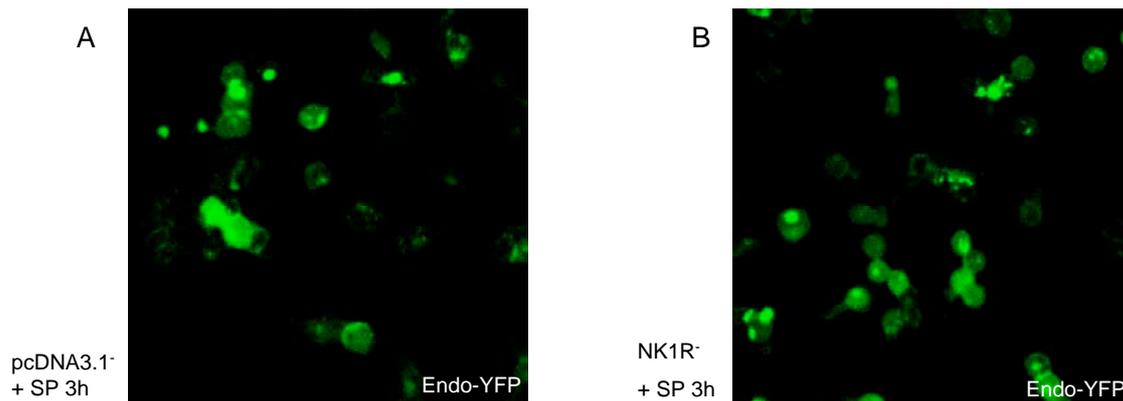


Figura 20. La morfología de los endosomas no cambió significativamente durante la MCP inducida por SP/NK₁R. Células incubadas con SP durante 3h y transfectadas en A) con el vector vacío pcDNA3.1⁻ y en B) con NK₁R. Barra de escala 30 μ m.

8. Síntesis de dos siRNA contra Nur77 y estandarización de las condiciones de transfección del siRNA.

Inicialmente se planeó silenciar la expresión de Nur77 mediante interferencia de RNA para determinar la especificidad de la señal del anticuerpo en los experimentos de inmunocitoquímica. Además, otros experimentos en el laboratorio contemplan eliminar específicamente la expresión de la proteína Nur77, por lo que se decidió optimizar la interferencia del mRNA de Nur77. Si bien, previamente se habían utilizado siRNA para Nur77, estos solamente redujeron en 50% su expresión. Por lo tanto, para buscar un silenciamiento mayor, se diseñaron 4 nuevos blancos de siRNA considerando los siguientes criterios: secuencias de 21 nucleótidos iniciadas por 3' AA, contenido nucleotídico de GC en las secuencias del 30-53%, no poseer más de 16 nucleótidos contiguos de homología con cualquier otro mRNA y tener un valor termodinámico $\Delta G < 0.2$ kcal/mol. De los 4 candidatos, se sintetizó solamente el que teóricamente se predice que tendrá un mayor efecto de silenciamiento.

La eficiencia del nuevo siRNA será probada experimentalmente por análisis de *western blot* en comparación con el siRNA previo. En la **figura 21.A** se muestra un gel con estos siRNA. Por otro lado, las condiciones de lipofección de los siRNA fueron estandarizadas para un área de 0.8 cm² utilizando un siRNA fluorescente que no tiene blanco en el genoma de humano. La **figura 21.B** muestra la transfección del siRNA fluorescente Cy3 (Dharmacon).

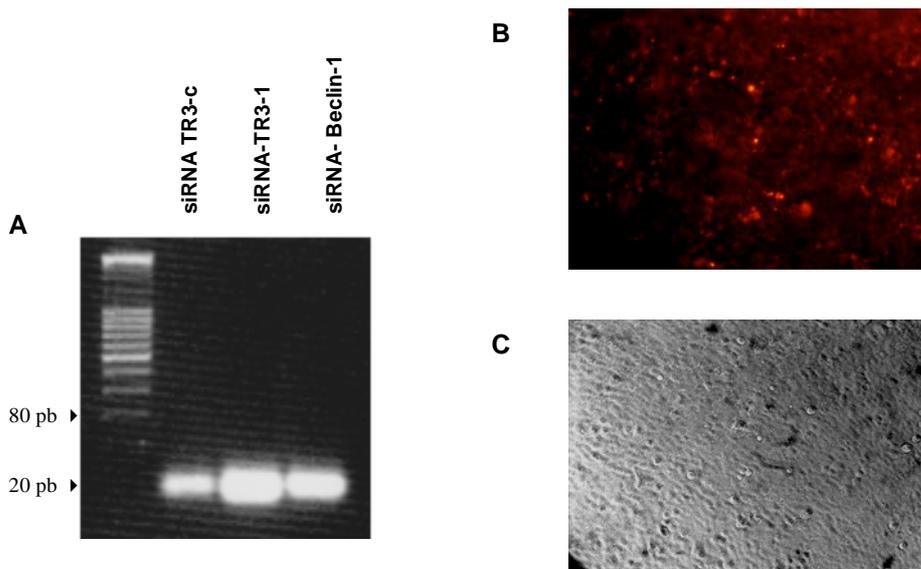


Figura 21. Síntesis de siRNA de Nur77 y transfección de un siRNA fluorescente. A La última banda del marcador de peso molecular para DNA corresponde a 80 pb. El tamaño de los siRNA es aproximadamente 21 bp. El siRNA Beclin-1 fue utilizado como control positivo para verificar el tamaño. Las condiciones de lipofección de siRNA en células HEK293 fueron estandarizadas utilizando un siRNA fluorescente B. En C se observa el campo claro.

IX. DISCUSIÓN

1. Análisis de la MCP inducida por SP/NK₁R

La inducción de la muerte no apoptótica mediada por Nur77 que se estudió en este trabajo, requiere de la señalización intracelular activada por SP ya que como se observa en el tercer bloque de la **figura 11.A**, la mera sobreexpresión de Nur77 (sin SP) no es suficiente para inducir muerte como cuando se activa después de la incubación con SP. Por otro lado, el hecho de que se observen más células muertas en los pozos transfectados con NK₁R y el vector vacío en comparación con las que solamente fueron transfectadas con el vector vacío en ausencia de SP (bloque 1 vs. bloque 2 **figura 11.A**) se puede deber a la presencia de un agonista de NK₁R en el suero utilizado para suplementar el medio de crecimiento.

Por otra parte, se sabe que en los cultivos celulares, ocurre apoptosis cuando las células pierden sus contactos célula-célula o su adherencia al sustrato, y este efecto se potencia durante el subcultivo al despegar las células por métodos enzimáticos. De hecho, se sabe que muchas de las células que se encuentran flotando en los platos de cultivo son células apoptóticas. Debido a que el conteo de células muertas se realizó mediante la prueba de exclusión de tinción de azul tripano (colorante que se acumula en las células muertas al difundir pasivamente a través de la membrana plasmática); no podemos discernir entre células que murieron por apoptosis o por muerte no apoptótica inducida por SP. Por lo tanto, parte de las células muertas en nuestros conteos también representa un número de células apoptóticas, aunque esta proporción se elimina al restar el número de células muertas que se observó cuando se transfectó el vector vacío. Otra consideración importante es el conteo de células muertas totales ya que éste arrojó números muy pequeños de células muertas en relación a la densidad del cultivo, por ejemplo, 120:2,000,000; y quizá no representa una proporción tan significativa de la densidad del cultivo, además de que muchas de las células que se encuentran adheridas al plato no son totalmente funcionales y muchas que se observaban redondeadas no se despegaron. Sin embargo, aun con estas limitantes del conteo, sí observamos que, en respuesta a SP, se observan, al menos, tres veces más células muertas que sin SP.

2. Efecto protector de la muerte celular por la sobreexpresión de Nur77

Interesantemente, contrario a lo que se hubiera pensado, la sobreexpresión de Nur77 no tiene un efecto potenciador de la MCP y por el contrario previene, en cierto grado, la muerte en general (comparar bloque 1 vs. bloque 3 de la **figura 11.A**). Tomando como punto de partida nuestros resultados y otros del laboratorio que indican que Nur77 reside en el núcleo y que es transcripcionalmente activo durante la muerte inducida por SP/NK₁R, consideramos posible un mecanismo por el cual Nur77 podría estar protegiendo de muerte en este caso. Por ejemplo, la cantidad de proteína expresada cuando se sobreexpresa Nur77 podría superar el umbral de modificaciones postraduccionales necesarias, como la fosforilación o la sumoilación, que lo activen para inducir la transcripción específica de genes que inducen muerte, mientras que las otras moléculas de Nur77, por ejemplo las no modificadas postraduccionalmente, estarían activando genes de sobrevivencia, lo cual tendría sustento en el caso de que un mismo factor transcripcional tuviera diferentes blancos dependiendo de sus modificaciones postraduccionales. O podría ser el caso de que Nur77 en exceso estaría actuando como dominante negativa. También, está reportado que Nur77 está sobre expresado en diferentes células cancerosas y que Nur77 puede conferir ventajas de crecimiento a éstas; además también se sabe que la sobreexpresión de Nur77 también bloquea la muerte celular inducida por ceramidas (Revisado en Moll *et al.* 2006). O también existe la posibilidad de que Nur77 podría proteger de muerte por un mecanismo alternativo a la transcripción y quizá relacionada con el reclutamiento o activación de cofactores.

Por otro lado, a pesar de que la sobreexpresión de Nur77 protege de muerte, continuó induciendo muerte, en presencia de SP, más que en su control. Aunque quizá, el efecto de la disminución de la muerte, pudo haber tenido alguna influencia en nuestro trabajo cuando se intentó determinar la localización celular de Nur77::GFP y quizá también tuvo que ver con la discrepancia en la localización de Nur77::GFP que observamos cuando teñimos con el marcador de mitocondrias o con el del aparato de Golgi.

3. Análisis de la distribución nuclear vs. citoplásmica de Nur77::GFP

Como anteriormente se mencionó, existía evidencia suficiente para creer que durante la MCP inducida por SP/NK₁R, Nur77 podría estar actuando tanto en citoplasma como en núcleo. Por un lado, el efecto inhibitorio de la muerte celular de las dominantes negativas de Nur77 ($\Delta 152$ y Δ DBD) (Castro-Obregón *et al.* 2004), y por otro lado, la potencial interacción de Nur77 con ERK2, la probable translocación de Nur77 a un organelo implicado en la regulación o progresión de la autofagia y finalmente, en observaciones previas se había visto que en respuesta a SP, una porción de Nur77::GFP salía del núcleo (Castro-Obregón, datos no publicados).

A pesar de que la sobreexpresión de Nur77 reduce la muerte celular, utilizamos la proteína de fusión Nur77::GFP para analizar su localización, ya que la sobreexpresión aun seguía matando a las células, más que en el control. Además, en varios reportes, otros grupos habían utilizado la proteína de fusión Nur77::GFP (Li *et al.* 2000, Cao *et al.* 2004, Kolluri *et al.* 2003, Léséleuc *et al.* 2006). En nuestro caso, observamos una porción de Nur77::GFP que se translocaba al citoplasma en respuesta a SP, solamente cuando Nur77 se hiper expresaba, así mismo, también observamos Nur77::GFP en los citoplasmas de células apoptóticas y mitóticas (**figura 12.F**). Cabe destacar que en ninguno de estos casos, la exportación al citoplasma fue masiva, ni la señal del núcleo desapareció completamente, como en el caso de la apoptosis mediada por Nur77. Más adelante discutiré sobre las implicaciones que pudiera tener la presencia de Nur77 en el citoplasma durante la mitosis. Por otro lado, en respuesta a SP, observamos un cambio en la intensidad de la señal de Nur77::GFP, **Figura 12.B,C,D**. En este caso, parte del aumento de la intensidad se debe a que la expresión de Nur77 se induce en respuesta a SP; y por otra parte, aunque no se sabe pero es viable suponerlo es que la proteína Nur77 se estabiliza en respuesta a SP, por ejemplo, por disminución de su degradación.

Por otra parte, cuando se analizó la distribución de Nur77::GFP y su localización en la mitocondria, se observó que el 11% de las células presentaban un pequeña porción de Nur77::GFP citoplásmico (**figura 13**). Sin embargo, en este caso hay dos observaciones que deben ser tomadas en cuenta; primeramente, las células que tienen una fracción de Nur77 citoplásmico son las células donde se observan núcleos que hiper-expresan Nur77::GFP, con una señal de GFP mucho mayor que en los otros núcleos.

La segunda consideración es que esta señal observada en el citoplasma presenta un patrón ligeramente punteado, pero no co-localizó con las mitocondria. Con respecto al primer punto, no sabemos si Nur77::GFP de esas células está en el citoplasma porque nunca entró a núcleo, o salió del núcleo como resultado de la hiper expresión de la proteína de fusión. Por otra parte, cuando incubamos con el colorante del aparato de Golgi, no observamos Nur77::GFP en el citoplasma de las células de los campos que analizamos. Esto quizá se haya debido a que analizamos pocos campos y que se contaron menos de cien células, y además, un paso del protocolo de tinción del aparato de Golgi incluyó una incubación a 4 °C, y se sabe que el frío es un factor que bloquea la endocitosis. Por lo tanto, debido a esta discrepancia se procedió a buscar las señal endógena de Nur77.

1. Distribución subcelular de Nur77 endógeno

Al buscar la señal endógena de Nur77 se eliminaba el efecto protector de la muerte celular por parte de la sobreexpresión de Nur77. Sin embargo, a pesar de utilizar un anticuerpo específico anti Nur77, cabía la posibilidad de que este reaccionara de manera inespecífica y reconociera otros epítopes generando “ruido” en la señal observada. Por otra parte, el segundo factor a considerar, aunque menos probable, era que el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo reaccionara también de manera inespecífica. Por lo tanto, para contender con esas dos limitantes, y asegurarnos de que la señal de Nur77 era específica, se realizaron los controles que se explicaron en la **figura 17**.

El análisis de la localización de Nur77 endógeno indicó que éste reside en el núcleo durante las primeras 6h después de inducir muerte con SP/NK₁R en el 86% de las células transfectadas, mientras que en el restante 14% de éstas, Nur77 se observa tanto nuclear como citoplásmico. Debido a que 11% (el observado cuando se usó Nur77::GFP) y 14% son números muy similares, a primera impresión podría pensarse que ambos porcentajes representan el mismo fenómeno, sin embargo, tomando en cuenta la discrepancia observada cuando se utilizó la Nur77::GFP y también, debido a que el patrón de distribución de ésta no parece ser el mismo que del endógeno, la comparación pierde relevancia.

5. Translocación de Nur77 del núcleo a las mitocondrias o al retículo endoplásmico

Por otro lado, a pesar de que hubiera ocurrido una exportación masiva de Nur77 al citoplasma, cabía la posibilidad de que, con base a modelos anteriores, durante la MCP inducida por SP/NK₁R, Nur77 no se translocara a la mitocondria ni al RE ya que como anteriormente se describió, la muerte que ocurre cuando Nur77 se transloca a estos organelos es de tipo apoptótica. Por otra parte, con respecto a la proteína marcadora del retículo endoplásmico, calreticulina fusionada a CFP, tuvimos una muy baja eficiencia de transfección, y de hecho, las cantidades del plásmido pRE-CFP a transfectar fueron duplicadas y hasta triplicadas, (mientras que la cantidad del plásmido del receptor NK₁ se mantuvo constante), para obtener una mejor eficiencia de transfección, y aun así fue difícil encontrar células doble positivas, es decir, que expresaran Nur77 y calreticulina::CFP.

6. Translocación de Nur77 del núcleo a los endosomas

por otra parte, en el caso de los endosomas, sí tenía sentido suponer que Nur77 se dirigiera a éstos ya que ahí se localiza la cascada de fosforilación necesaria para la progresión de la MCP inducida por SP/NK₁R. Por otro lado, a pesar de que la internalización del receptor requiere de endocitosis y de que la cascada de fosforilaciones antes descrita se localiza en los endosomas, no observamos una diferencia significativa en la distribución de éstos en las células que fueron transfectadas con NK₁R en comparación con las células control (**figura 20**). Esta observación fue hecha tomando en cuenta la distribución de la señal de la proteína marcadora de endosomas, la cual se observa definida y nítidamente en la membrana plasmática cuando no hay estímulos que inducen la internalización de endosomas; y de manera contraria, cuando hay actividad endocítica, la señal del marcador se puede observar en el citoplasma y de manera más difusa. Sin embargo, al aumento en que se observa la **figura 20** esta distinción no es tan clara y tajante. Cabe mencionar que la GTPasa Rho-B, marca endosomas tempranos por lo cual quizá no se observó un cambio significativo en la distribución de los endosomas, pues lo observamos a las 3 horas.

7. Localización de ERK2 y la potencial fosforilación de Nur77

Por otro lado, otro de los datos que nos llevaron a pensar que Nur77 podría dirigirse a los endosomas es el hecho de que la cinasa ERK2 es necesaria para la progresión de la MCP no apoptótica y además, también se sabe que durante este tipo de muerte, ERK2 fosforilada activa se asocia con el complejo de arrestina 2, localizado en los endosomas. Por lo tanto, debido a que Nur77 se fosforila durante la MCP y a que Nur77 puede ser fosforilado *in vitro* por ERK2, consideramos la posibilidad de que Nur77 interactuara directamente con ERK2 para ser fosforilado. En este caso, la exportación de Nur77 del núcleo al citoplasma explicaría la interacción de Nur77 con ERK2. Por otra parte, la fosforilación de los sustratos de ERK2 tiene relevancia en el contexto de la muerte ya que; por ejemplo, la compartimentalización de ERK2 en los endosomas y su separación del núcleo no permite que ésta fosforile a sus sustratos clásicos, con efectos mitogénicos, como E2F, durante la MCP inducida por SP/NK₁R. Esto indicaría, de cierto modo, cómo una cinasa clásicamente asociada a proliferación, media un proceso de MCP no apoptótico.

Por otro lado, con respecto a la potencial fosforilación de Nur77 por ERK2, si después, el análisis de la fosforilación de mutantes⁴ de Nur77 del sitio potencial de fosforilación por ERK2 se determinara que en efecto Nur77 se fosforila en este sitio y que esta fosforilación es necesaria para la progresión de la muerte, entonces habría un escenario posible donde ERK2 y Nur77 interactuaran con una cinética tan rápida que no pudiéramos detectar su localización por el método de inmunocitoquímica a los tiempos observados. Por el contrario, si el análisis de la fosforilación de las mutantes de Nur77 mostrara que éste no se fosforila en el sitio potencial de ERK2, se consolidaría el dato de que Nur77 no se transloca a los endosomas. Entonces quedaría por buscar sustratos de ERK2 implicados en la progresión de la MCP inducida por SP/NK₁R.

8. Relevancia funcional de la porción de Nur77 citoplásmico

Queda por corroborar con mayor resolución si la señal de Nur77 que se observa fuera del núcleo es *bona fide* y no señal inespecífica. Para determinar eso, se podría bloquear la exportación nuclear de Nur77, mediante el uso del antígeno nuclear EBNA2 (antes descrito) o con una droga que bloquee específicamente a la proteína de poro que transloca a Nur77 hacia el citoplasma y determinar que efecto tiene esto sobre la MCP.

⁴ Están descritas más ampliamente en la parte de “Perspectivas”. De manera general, esta mutante tendrá mutagenizado el sitio potencial de fosforilación, la T143 por una A.

También se podría silenciar la expresión de Nur77 con siRNA, para determinar si la señal que se observa en el citoplasma también disminuye con el siRNA. Será importante determinar si esa porción citoplásmica tiene alguna relevancia biológica o funcional y no desdeñar ese pequeño porcentaje de células que presentan Nur77 perinuclear ya que por ejemplo, en el caso de la apoptosis mediada por Nur77, solamente en el 15-20% de las células transfectadas con Nur77 éste se transloca a la mitocondria (Li *et al.* 2000), proporción similar a la que nosotros encontramos. Sin embargo, en este caso de apoptosis, toda la señal de Nur77 se observa en el citoplasma y nada en el núcleo.

9. Aparato de Golgi y lisosomas, dos organelos implicados en autofagia

Debido a limitaciones de tiempo, no se completó la búsqueda de la señal endógena de Nur77 y su posible translocación al aparato de Golgi y lisosomas, siendo ambos, candidatos interesantes para la translocación de Nur77 debido a su implicación en la progresión de la autofagia. De hecho, el complejo de Golgi queda todavía como un candidato potencial debido a la localización del complejo de la PI3K tipo III, necesario para la expansión de las membranas de aislamiento. Por otra parte, debido a que los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para la degradación de los sustratos durante la autofagia, cabría la posibilidad de que Nur77 se translocara a los lisosomas. Sin embargo, no parecen tan evidentes los efectos que Nur77 pudiera tener al localizarse en la membrana lisosomal al interactuar con alguna proteína conocida; aunque es posible que la presencia de Nur77 en los lisosomas pueda ser necesaria o facilitar la fusión de éstos a los autofagosomas, sin embargo, no evidencia de que esto ocurra. Por lo tanto, queda por determinar si Nur77 se transloca a los lisosomas durante la MCP inducida por SP/NK₁R.

10. Posible influencia del ciclo celular en la respuesta a SP o al efecto de Nur77

Debido a varias observaciones sobre el comportamiento de las células HEK293 y su respuesta a la SP o a Nur77, consideramos que alguna etapa en particular del ciclo celular tendría alguna influencia en la respuesta a SP o en la distribución de Nur77. Por una parte, es importante considerar que la SP en solución acuosa, como el medio de crecimiento, tiene una estabilidad de no más de 30 minutos, aproximadamente; por lo tanto, cuando las células se incubaron con SP por tiempos mayores a los 30 minutos en la realidad lo que se evaluó fue el efecto 3 horas después de adicionar la SP sobre las células.

La cuantificación de la muerte se realizó 24 horas después de añadir SP, para observar un efecto mayor en la muerte celular; lo cual abre dos consideraciones, por una parte, una es que el proceso de muerte sea lento y se complete en más de 20 horas, o por otra parte, es que las células son responsivas a la SP solamente en un estado del ciclo celular y que la señal de muerte se active al estar en contacto con la SP, pero que la ejecución de la muerte, por ejemplo por Nur77, proceda hasta que la célula está en una etapa del ciclo en la cual Nur77 puede actuar. Por lo tanto, un mayor número de células muertas se observarían a las 24 horas, ya que todas las células al menos una vez pasaron por todas las etapas del ciclo celular. Esta idea tendría mayor sustento si se observaran células muertas a partir de las primeras horas post incubación con SP.

Por otra parte, y continuando un poco con la misma noción de la influencia del ciclo celular sobre la respuesta de Nur77; podría ser que observamos Nur77 citoplásmico sólo en una subpoblación porque el cultivo celular no está sincronizado, y tal vez si observáramos a más tiempos, se podrían descubrir más células con Nur77 translocado fuera del núcleo. Debido a que el efecto observado en la distribución de Nur77 no es homogénea ni mayoritaria, esto nos llevó a considerar que la distribución de Nur77 cuando se observa también citoplásmico, podría ser dependiente del ciclo celular y de hecho podrían ser células en la etapa G_2 ⁵. Aunque esta observación es meramente correlativa, se sabe que Nur77 tiene efectos sobre el ciclo celular ya que puede inducir progresión éste, arrestar las células en G_0/G_1 o inducir la expresión de genes que participan en la regulación del ciclo celular como *p21wif1/cip*. Por lo tanto, el 14% de células en las que se observó Nur77 citoplásmico podrían corresponder a las células que en determinado momento del ciclo celular, por ejemplo en G_2 , tienen Nur77 en el citoplasma y ahí activa alguna función relacionada al ciclo celular.

Por otra parte, la observación de Nur77::GFP en el citoplasma de las células mitóticas es de particular interés (**figura 12.F**). Si consideramos que Nur77 durante la mitosis se encuentra totalmente citoplásmico, como resultado de la pérdida de la membrana nuclear, y potencialmente libre para interactuar con cualquier organelo, incluyendo mitocondrias o retículo endoplásmico; entonces, ¿qué es lo que le impide dirigirse ahí y activar apoptosis?

⁵ Esta consideración surge de lo siguiente: si las células HEK293 completan un ciclo de división en aproximadamente 24h, y la etapa de G_2 dura aproximadamente 3h, entonces, por probabilidad, aproximadamente el 13% de las células en el cultivo estarían en la etapa de G_2 .

Por una parte, se sabe que en la formación del heterodímero con RXR, éste aporta las señales de exportación nuclear necesarias para la translocación de Nur77 a la mitocondria, en este caso, la inducción de la formación del dímero estaría ausente. Por otra parte, en contraste al patrón punteado, de Nur77 citoplásmico, que se observa cuando éste induce apoptosis, durante al mitosis, Nur77::GFP se observa, a juzgar de la resolución y aumento de la imagen, difuso más que punteado. Bajo estos supuestos, podemos quizá suponer que durante la mitosis Nur77::GFP no se transloca a la mitocondria ni al RE, ni induce apoptosis. Sin embargo, por otro lado, no tenemos los elementos suficientes para argumentar que Nur77 no pudiera interactuar con algún otro organelo, o ser fosforilado en el citoplasma durante la mitosis, por lo tanto, deja abierta esta posibilidad de activación de Nur77 o activación por Nur77 durante la mitosis y también la pregunta de que pasa en las células post mitóticas que expresaban previamente Nur77.

Por lo anterior, debido a la seria de implicaciones que parece tener la etapa del ciclo celular sobre Nur77, será necesario sincronizar los cultivos para observar una respuesta más homogénea de la localización y distribución de Nur77. Una manera sencilla y rápida de sincronizar los cultivos puede ser mediante la eliminación de suero y posterior administración de éste; o también se puede considerar el uso de drogas para sincronizar a las células, aunque esto implicaría más efectos colaterales. Por otra parte, resultará interesante determinar si Nur77 se transloca a los cuerpo PML, aunque hay evidencia de que Nur77 forma nuevas estructuras nucleares diferentes a los PML, y la localización de Nur77 en estos cuerpos causa su arresto transcripcional (Léséleuc *et al.* 2006). Sin embargo, debido a que Nur77 interactúa con PML todavía podría existir la posibilidad de que se localice en los cuerpos PML. De ser así, sería interesante ver si Nur77 sufre alguna modificación pos-traduccionál en especial, cuando se transloca ahí.

11. Evidencia de la función nuclear de Nur77

A pesar de tener una localización constitutivamente nuclear, la mutante dominante negativa de Nur77 inhibe la MCP no apoptótica, sin embargo, esta mutante no es totalmente funcional porque carece de los sitios de transactivación necesarios para la trans-activación y reclutamiento de cofactores; además recientemente en el laboratorio se determinó que Nur77 es transcripcionalmente activo durante la MCP inducida por SP/NK₁R (Rodríguez-Valentín, datos no publicados). Por lo tanto, lo más probable es que la progresión de la MCP mediada por SP/NK₁R requiere de la localización nuclear de Nur77 (*i.e.* como represor o activador

transcripcional). Considerando además que la muerte inducida por SP/NK₁R requiere de transcripción para proceder (Castro-Obregón *et al.* 2004) resulta esencial identificar los genes regulados por Nur77 que están implicadas en el desencadenamiento de la MCP no apoptótica. Finalmente, hay que destacar que las células HEK293 están transformadas con los genes E1A y E1B de adenovirus, los cuales estabilizan e inactivan a p53, respectivamente. Por lo tanto, habría que considerar que p53, siendo un controlador central en la célula y un interactor crucial de Nur77, está fuera del sistema y pudiera ser el caso de que algunas de las funciones de Nur77 mediadas con o coordinadas con p53, no estén presentes y por lo tanto los fenómenos que regulen, no se observen en las células HEK293.

12. Activación transcripcional de Nur77 relacionada con gluconeogénesis, ¿la conexión con autofagia?

Recientemente se ha elucidado una nueva función de Nur77 como regulador transcripcional del metabolismo hepático de la glucosa. En este paradigma, Nur77 es un mediador de la acción de cAMP en el control hormonal de la gluconeogénesis. Tanto condiciones de ayuno como el glucagon inducen un aumento en la expresión de los miembros de la familia Nur77. Específicamente, Nur77, junto con PGC-1 α y HNF-4 α , promueve la transcripción de genes involucrados en la gluconeogénesis, estimula la producción de glucosa y aumenta los niveles sanguíneos de glucosa. Por otra parte, un dato interesante es que este grupo no observó un efecto de la insulina sobre la expresión de Nur77 y de hecho, no saben en dónde la insulina se conecta con la ruta gluconeogénica de Nur77. Además, consideran probable que Nur77 pudiera ser modificado en respuesta a insulina, induciendo su relocalización y alterar su distribución subcelular e incrementar su degradación (Pei *et al.* 2006). Interesantemente, la modulación, por parte de Nur77, de genes implicados en gluconeogénesis podría establecer una posible conexión de la actividad transcripcional, y nuclear, de Nur77 con la ruta autofágica. Por ejemplo, se sabe que tanto el glucagon como la supresión de aminoácidos son potentes inductores de autofagia. Por una parte, el glucagon aumenta el uso de aminoácidos como glicina, alanina, glutamato y particularmente glutamina, pero no bloquea la producción de cAMP ni la gluconeogénesis (Schworere *et al.* 1979). Por lo tanto, debido a que Nur77 induce gluconeogénesis y aumenta los niveles de glucosa, la propia hiperactividad gluconeogénica lleva a la supresión de un aminoácido gluconeogénico, la glutamina, y por lo tanto, la disminución de aminoácidos lleva a la activación de la autofagia.

X. CONCLUSIONES

- Nur77 se mantiene totalmente en el núcleo en el 86% de las células que lo expresan en respuesta a SP mientras que en el resto de las células Nur77 se observa además citoplásmico.
- Nur77 exportado del núcleo al citoplasma no co-localiza con la mitocondria, retículo endoplásmico, ni endosomas; más bien reside en el citoplasma.

XI. PERSPECTIVAS

Los mecanismos por lo cuales Nur77 regula la MCP son complejos y su papel como modulador, más que como ejecutor, lo coloca en un punto nodal en la mediación de varios tipos de MCP. Sin embargo, con los nuevos resultados vamos comprendiendo mejor los mecanismos moleculares de Nur77 en la modulación de la MCP mediada por NK₁R/SP.

Otros experimentos ayudarán a comprender mejor la dinámica de Nur77 y algunas de las moléculas que lo regulan. Por ejemplo, se podrían realizar co-inmunoprecipitaciones de Nur77 y ERK2 para determinar si estas interactúan directamente. En caso de determinar que fuera el caso, sería interesante ver el efecto que tienen mutantes de Nur77 del sitio de fosforilación de ERK2 sobre la progresión de la muerte celular. Además, indirectamente se podría comparar el efecto de la fosforilación sitio específica en Nur77 sobre su función, por ejemplo, contrastando con un modelo de proliferación mediado por Nur77.

Por otra parte, debido a que la fosforilación tiene un efecto crucial en la modulación de la función de Nur77 y además de que se sabe que durante la MCP inducida por SP/NK₁R Nur77 se fosforila en treoninas (Castro-Obregón *et al.* 2004), sería importante determinar si Nur77 es fosforilado en el sitio potencial de ERK2. Para determinar ese objetivo, una estrategia podría consistir en eliminar el sitio potencial de fosforilación de Nur77, la treonina 143, mediante mutagénesis sitio dirigida. Inicialmente se introduciría el epítoto FLAG a Nur77 para distinguir a la proteína endógena de versiones mutantes. Después se generarían las mutantes puntuales del sitio de fosforilación cambiando la treonina por un residuo de alanina (ERK2 no fosforila en alaninas), finalmente se inmunoprecipitaría a Nur77 con un anticuerpo anti-FLAG y se detectaría la fosforilación con un anticuerpo que reconozca treoninas fosforiladas. Actualmente construí un vector en el que incorporé el epítoto FLAG en el extremo amino terminal de Nur77. La funcionalidad de la construcción podría ser comprobada mediante análisis de *western blot* con anti-FLAG, una vez comprobado esto se podría generar la mutante. Estas mutantes podrían transfectarse, independientemente, en las células HEK293 y se podría silenciar la señal endógena mediante un siRNA específico para la secuencia endógena. Debido a que la secuencia de Nur77 es la misma en el caso de la mutante y del endógeno, éste siRNA se podría diseñar para una secuencia específica en la que en la proteína mutante se haya cambiado el código de codones.

Además, para determinar si la actividad transcripcional de Nur77 es necesaria para la progresión de la MCP, se podría utilizar una proteína dominante negativa (que bloquee también el efecto redundante de NOR1) con mutaciones en los sitios de unión a DNA, pero con localización nuclear para evaluar su efecto en la progresión de la muerte. O por ejemplo, se sabe que la cinasa Akt fosforila a Nur77 en la serina 351 y que esta fosforilación inhibe la translocación de Nur77 al citoplasma y además bloquea su actividad transcripcional. Considerando eso, se podría mutagenizar la serina 351 de Nur77 y reemplazarla con un residuo de ácido aspártico para mimetizar el efecto de la fosforilación e inhibir así la actividad transcripcional de Nur77 para evaluar su efecto en la muerte. Por otra parte, también se podría utilizar una versión mutante de Nur77 que tenga eliminados los sitios de transactivación en AF-1; esta mutante conservaría tanto las señales de localización nuclear como las de exportación nuclear pero carecería de la función de trans-activación y de reclutamiento de co-activadores. Por otro lado, debido a que el DBD de Nur77 es un dedo de zinc, se podría eliminar el zinc del sistema y determinar el efecto en la muerte celular. Sin embargo, muchos otros más factores transcripcionales codifican también dedos de zinc, por lo tanto, el efecto que se observaría no sería específico.

Finalmente, la información que se genere sobre Nur77 no solamente repercutirá en un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de la muerte celular en enfermedades neurodegenerativas sino también de mecanismos homeostáticos antitumorales. También, el conocimiento de las proteínas que interactúan directamente con Nur77 y de las modificaciones alternativas o cooperativas a la fosforilación que regulen su actividad; así como determinar su efecto *in vivo*, ayudarán a entender mejor los mecanismos moleculares de este versátil receptor nuclear en la mediación de la MCP no apoptótica.

Abreviaciones

- AHPN *Ácido carboxílico 6-[3-(1-adamantil)-4- hydroxifenil]-2-naftaleno*
- AIF *Apoptosis Inducing Factor*
- ANT *Adeninde nucleotide translocator*
- Apaf-1 *Apoptosis Protease-Activating Factor-1*
- Bcl-2 *B-cell/Lymphoma-2*
- BH1-4 *Bcl-2 Homology 1-4*
- CARD *Caspase recruitment domain*
- CDKs *Ciclinas dependiente de cinasas*
- DBD *Dominio de unión a DNA*
- DED *Death effector domain*
- DIABLO *Direct IAP binding protein*
- EBNA2 *Epstein Barr Nuclear Antigen 2*
- EGF *Epidermal Growth Factor*
- FADD *Fas-Associating Protein with Death Domain*
- GATE-16 *Homólogo de Atg8; Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDA*
- GABARAP *Homólogo de Atg8; γ -Aminobutiric Acid type A Receptor-Associated Protein.*
- HDAC *Histone Deacethlase*
- IAP *Inhibitory of Apoptosis Protein*
- LBD *Ligand binding domain*
- MAP- LC3 *Light Chain 3 of Microtubule Associated Protein*
- MDM2 *Mouse Double Minute protein*
- MEF2 *Myocyte enhancer factor 2*
- mTOR *Mammalian Target of Rapamycin*
- PDK1 *PI(3,4,5)P3-Dependent Kinase 1*
- PI3K *Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*
- POMC *Pro-opiomelanocortin*
- PTEN *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten*
- PTPCP *permeability transition pore complex*
- Rheb *Ras homolog enriched in brain*

- RIP-1 *Receptor Interacting Protein 1*
- RAR *Retinoic Acid Receptor*
- RXR *Retinoic X Receptor*
- SMAC *Second mitochondrial activator of caspases*
- TRADD *TNF-Receptor Associated Death Domain*
- TSC1/ TSC2 *Tuberous sclerosis 1/2 gene.*
- VDAC *Voltage dependent anions channel*
- Vps34 *Vacuolar protein sorting 34*

XI. REFERENCIAS

- **Cain K, Bratton SB, Cohen GM. (2002)** *The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex.* Biochimie; 84(2-3):203-14.
- **Cao X., Liu W., Lin F., Li H., Kolluri SK., Lin B., Han Y., Dawson M., Zhang X. (2004)** *Retinoid X Receptor Regulates Nur77/Thyroid Hormone Receptor 3-Dependent Apoptosis by Modulating Its Nuclear Export and Mitochondrial Targeting.* Molecular and Cellular Biology Vol. 24, No. 22
- **Cassens U, Lewinski G, Samraj AK, von Bernuth H, Baust H, Khazaie K, Los M. (2003)** *Viral modulation of cell death by inhibition of caspases.* Arch Immunol Ther Exp.; 51(1):19-27.
- **Castro Obregón S. y Covarrubias Robles LF:** “Muerte Celular Programada”, Pp.617-660 en Biología Celular y Molecular (Luis F. Jiménez, ed.). –México, DF: Prentice Hall, 2003. –ISBN 970-26-0387-0
- **Castro-Obregon, S., Del Rio, G., Chen, S. F., Swanson, R. A., Frankowski, H., Rao, R. V., Stoka, V., Vesce, S., Nicholls, D. G., and Bredesen, D. E. (2002)** *Cell Death Differ.* 9, 807–817
- **Castro-Obregón, S., Rao, RV., Del Rio, G., Chen, SF., Poksay, KS., Rabizadeh S., Vesce, S., Zhang, X., Swanson RA., Bredesen, DE. (2004)** *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 279, No. 17, pp. 17543–17553
- **Chao LC, Zhang Z, Pei L, Saito T, Tontonoz P, Pilch PF. (2007)** *Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle.* Mol Endocrinol.
- **Chowdhury I., Tharakan B., Bhat G. (2006)** Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. Cellular & Molecular Biology Letters Vol. 11: 506-525.

- **Clarke PG** (1990) *Ant. Embryol.* 181: 195-213
- **Cuervo, A. M.** (2004) *Autophagy: in sickness and in health.* Trends in Cell Biology Vol. 14 No.2
- **Dal Canto MC, Gurney ME.** (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* Dec;145(6):1271-9.
- **Dal Canto, M. C., and Gurney, M. E.** (1994) *Am. J. Pathol.* **145**, 1271–1279
- **Edinger AL., y Thompson CB.** (2004). *Death by design: apoptosis, necrosis and Autophagy.* Current Opinion in Cell Biology, 16:663–669
- **Eells J.B., Witta J. J. B., Otridge, Zuffova E., Nikodem V. M.** (2000) *Current Genomics. Structure and Function of the Nur77 Receptor Subfamily, a Unique Class of Hormone Nuclear Receptors.*
- **Eells, J.B., Witta, J., Otridge, J.B., Zuffova, E., & Nikodem, V.M.** (2000). *Structure and function of the Nur77 subfamily, a unique class of hormone nuclear receptors.* Cur. Genomics. 1, 135-152.
- **Ekert PG., Metcalf D., Roberts AW., Huang DCS., Kile BT.** (2007) *Cell* 128, 1173–1186.
- **Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P.** (2006) *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response.* Biochimica et Biophysica Acta 1757:1371 – 1387.
- **Furuchi, T.; Anderson, R. G. J.** (1998) *Biol. Chem.*, 273, 21099274, 32975.
- **Gozuacik D., Kimchi A.** (2007) *Autophagy and cell death.* Curr Top Dev Biol.;78:217-45.

- **Huettenbrenner S., Maier S., Leisser C., Polgar D., Strasser S., Grusch M., Krupitza G.** (2003) *The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity.* Mutation Research 543 235-249
- **Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, Guroff G.** (2000) *Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B.* Nature Cell Biology. Jul;2(7):435-40.
- **Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.** (1972) *Br. J. Cancer* **26**, 239–257.
- **Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T.** (2001) *Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network.* EMBO Rep. Apr;2(4):330-5.
- **Kim H., Kim B.Y., Soh J.W., Cho E. J., Liu J. O., Youn H.D.** (2006) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348 950–956
- **Kolluri SK., Bruery-Sedadno N., Cao X., Bingzhen L., Lin F., Han Y., Dawson M., Zhang X.** (2003) *Mitogenic Effect of Orphan Receptor TR3 and its Regulation by MEK1 in Lung Cancer Cells.* Molecular and Cellular Biology. p. 8651-8667
- **Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C.**(2007) *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.* Physiol Rev.; 87(1):99-163.
- **Lam D, Golstein P.** (2005) *Genetic approaches to molecular mechanisms of programmed cell death in Dictyostelium.* J Soc Biol.;199(3):191-8.
- **Lettre G. y Hengartner, MO.** (2006) *Developmental apoptosis in C. elegans: a complex CEDnario.* Nature Reviews Molecular Cell Biology Vol. 7
- **Lew J.** (2003) *MAP kinases and CDKs: kinetic basis for catalytic activation.* Biochemistry.Feb 4;42(4):849-56.
- **Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J. A., Reed, J. C., and Zhang, X.** (2000) *Cytochrome*

c Release and Apoptosis Induced by Mitochondrial Targeting of Nuclear Orphan Receptor TR3. Science **289**, 1159–1164

- **Liang B, Song X, Liu G, Li R, Xie J, Xiao L, Du M, Zhang Q, Xu X, Gan X, Huang D. (2007)** *Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis.* Exp Cell Res. May 10
- **Lin B., Kolluri SK., Lin F., Liu W., Han Y., Cao X., Dawson M., Reed JC., Zhang X. (2004)** *Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3.* Cell **116**;527-540
- **Luciano F, Krajewska M, Ortiz-Rubio P, Krajewski S, Zhai D, Faustin B, Bruey JM, Bailly-Maitre B, Lichtenstein A, Kolluri SK, Satterthwait AC, Zhang XK, Reed JC. (2007)** *Nur77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma.* Blood;109(9):3849-55.
- **Mason KD., Carpinelli MR., Fletcher JL., Collinge JE., Hilton AA., Ellis S., Kelly PN., Mineo, C.; Anderson, R. W.; White, M. A. J. Biol. (1997)** Chem., 272, 10345.
- **Mizushima M. (2005)** *The pleiotropic role of autophagy: from proteic metabolism to bactericide.* Cell Death and Differentiation. 12, 1535-1541
- **Moll UM, Marchenko N, Zhang XK. (2006)** *p53 and Nur77/TR3- transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction.* Oncogene. Aug 7;25(34):4725-43.
- **Mullican SE., Zhang S., Konopleva M., Ruvolo V., Andreeff M., Milbrandt J., Conneely OM. (2007)** *Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 andNr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia.*Nat Med. May 21
- **Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. (1990)** *A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells.* Nucleic Acids Research, Vol. 18, No. 20, 6169

- **Oshumi Y.** (2001) *Molecular Dissection of Autophagy: Two Ubiquitin-Like Systems.* Nature Reviews. Vol 2. pp. 211-216
- **Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P.**(2006) *NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism.* Nat Med. 2006 Sep;12(9):1048-55.
- **Schworer CM, Mortimore GE.** (1979) *Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids.* Proc Natl Acad Sci USA. Jul;76(7):3169-73.
- **Slagsvold HH., Ostvold AC., Fallgre AB., Paulsen RE** (2002). *Nuclear Receptor and Apoptosis Initiator NGFI-B is a Substrate for Kinase ERK2.* Biochemical and Biophysical Research Communications **291**, 1146-1150
- **Sophie Cornillo, Colette Foa, Jean Davoust, Nathalie Buonavista¹, Julian D. Gross** *Promyelocytic leukemia protein PML inhibits Nur77-mediated transcription through specific functional interactions.*
- **Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D. E.** (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14376–14381
- **Syntichaki P, Tavernarakis N.** (2002) *Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?* EMBO Rep. Jul;3(7):604-9.
- **Turmaine, M., Raza, A., Mahal, A., Mangiarini, L., Bates, G. P., and Davies, S. W.** (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8093–8097
- **Wansa KD., Harris JM., Yan G., Ordentlich P y Muscat GE.** (2003) *The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine.* J Biol Chem. 278(27):24776-90.
- **Wu WS, Xu ZX, Ran R, Meng F, Chang KS** (2002). *Promyelocytic leukemia protein*

PML inhibits Nur77-mediated transcription through specific functional interactions. Oncogene. May 30;21(24):3925-33.

- **Wingate AD., Campbell DG., Peggie M., Arthur JSC.,** (2006) *Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation.* Biochem. J 393, 715-724
- **Wingate AD., y Arthur JSC.,** (2006) *Post-translational control of Nur77.* Biochemical Society Transactions. Vol. 34, Part 6
- **Woronicz Jd., Lina A., Calnan BJ., Szychowski S, Cheng L, Winoto A.** (1995) *Regulation of the Nur77 Orphan Steroid Receptor in Activation-Induced Apoptosis.* Molecular And Cellular Biology, Nov. 1995, p. 6364–6376
- **Wu Q, Dawson MI, Zheng Y, Hobbs PD, Agadir A, Jong L, Li Y, Liu R, Lin B, Zhang XK. (1997a)** *Inhibition of trans-retinoic acid-resistant human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids.* Mol Cell Biol. Nov;17(11):6598-608.
- **Wu Q., Li Y., Liu R., Añadir A., Lee MO., Liu Y., Zhang X-k. (1997b).** *Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization.* The EMBO Journal Vol.16 No.7 pp.1656–1669
- **Y-H Han, X Cao, B Lin, F Lin, SK Kolluri, J Stebbins, JC Reed, MI Dawson and X-k Zhang. (2006)** *Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt.* Oncogene 1–13
- **Y-H Han, X Cao, B Lin, F Lin, SK Kolluri, J Stebbins, JC Reed, MI Dawson and X-k Zhang. (2006)** *Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt.* Oncogene 1–13
- **Zhang J., Barak LS., Winkler KE., Caron MG., Ferguson SSG.** (1997) *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 43, Pp. 27005–27014.

- **Zhao BX, Chen HZ, Lei NZ, Li GD, Zhao WX, Zhan YY, Liu B, Lin SC, Wu Q.**
(2006) *p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3.* EMBO J.; 25(24):5703-15