



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DEL  
RECEPTOR NUCLEAR Nur77

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

GABRIELA ZÁRRAGA GRANADOS

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN

2008





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Zárraga  
Granados  
Gabriela  
(55) 5644-9555  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Faculta de Ciencias  
Biología  
30020615-3

### 2. Datos del asesor

Dra.  
Susana  
Castro  
Obregón

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Luis Fernando  
Covarrubias  
Robles

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.  
Martha Verónica  
Vázquez  
Laslop

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Susana  
López  
Charreton

### 6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Víctor Manuel  
Valdés  
López

### 7. Datos del trabajo escrito

Título: Modificaciones postraduccionales del receptor nuclear Nur77  
Número de páginas:  
Año: 2008

## AGRADECIMIENTOS

A los doctores Luis Covarrubias y Susana Castro por darme el espacio y las condiciones para el trabajo experimental de esta tesis, sobre todo gracias por permitirme aprender de ustedes. Gracias a mis sinodales: la Dra. Martha Vázquez, Dra. Susana López y Dr. Víctor Valdés; por su dedicación en la revisión de este escrito. A la Dra. María Estela Andrés por las construcciones SUMO-1-CS2+MT, HA-SUMO-1-pcDNA3, SV5-Ubc9h-pcDNA3 y HA-PIAS $\gamma$ -CGN.

A los doctores Ramón González, Gustavo Pedraza y Claudia Treviño que amablemente nos proporcionaron reactivos clave para concluir los experimentos. A Andrés Saralegui por la ayuda en la unidad confocal. A Haven por sus conocimientos bioinformáticos para llevar a cabo el alineamiento.

A mis padres que a todo lo largo de mi vida me han apoyado en mis decisiones, más aún durante mi estancia en Cuernavaca. Ofe, muchas gracias por ser el gran pilar familiar. A las personas que no participaron directamente en este proceso, pero que siempre han estado allí: Anaí Sánchez, Gema Flores, Erika Loyo y Nora Ríos; gracias por no dejarme "tirar la toalla" cuando los experimentos se complicaban.

A Conchita, Irma González y Chris Wood por las asesorías. A "La Teques", muchas gracias por las recomendaciones, consejos y apoyo de todos los días. A Rocío Hernández, Gilda "La Chiquirriquis", "Niur", Manuel, David, "Gin-ema", Carlos Mojica y "El Vecino"; gracias por el compañerismo y numerosos momentos agradables que amenizaron el trabajo en el laboratorio. Particularmente al "Dr. Watus (JAF)" por los comentarios y sugerencias sobre el trabajo. A Carmen, por tener siempre buena disposición para ayudarnos en el laboratorio.

Este trabajo se realizó con apoyo de los donativos CONACyT PQ-46174 e ICGEB/CRP/MEX06/03 para Susana Castro Obregón.

## ÍNDICE

I. ABREVIATURAS .....	6
II. RESÚMEN .....	8
III. INTRODUCCIÓN .....	9
A. Tipos de muerte .....	9
B. Muerte celular autofágica .....	12
C. Nur77, receptor nuclear implicado en muerte celular .....	18
D. Modificación postraduccional por SUMO .....	21
IV. ANTECEDENTES .....	27
A. Muerte celular programada no apoptótica mediada por SP/NK <sub>1</sub> R .....	27
B. Posible sumoilación de la familia de Nur77 .....	28
V. HIPÓTESIS .....	30
VI. OBJETIVO GENERAL .....	30
A. Objetivos particulares .....	30
VII. MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
A. Microbiología .....	31
1. Bacterias quimiocompetentes .....	31
2. Bacterias electrocompetentes .....	34
B. Biología molecular .....	37
1. Purificación de plásmidos .....	37
2. Western blot .....	45
3. Inmunoprecipitación .....	54
C. Biología celular .....	57
1. Mantenimiento celular .....	57
2. Almacenaje de células .....	59
3. Transfección transitoria por CaCl <sub>2</sub> .....	60
4. Modelo de muerte celular mediada por SP/NK <sub>1</sub> R .....	62
5. Inmunofluorescencia .....	63
VIII. RESULTADOS .....	66
A. Sumoilación general de proteínas durante la muerte inducida por SP/NK <sub>1</sub> R .....	66
B. Comparación de las secuencias entre los miembros de la familia NR4A .....	68

C. Sumoilación de Nur77 <i>in vitro</i> .....	69
D. Nur77 se sumoila durante la muerte celular inducida por SP/NK <sub>1</sub> R .....	74
E. Distribución intracelular de Nur77 durante la muerte celular inducida por SP/NK <sub>1</sub> R .....	76
IX. DISCUSIÓN .....	79
X. PERSPECTIVAS .....	84
XI. CONCLUSIONES .....	86
XII. GLOSARIO .....	87
XIII. REFERENCIAS .....	89

## I. ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

Atg: genes relacionados con autofagia.

AF1: función de activación 1 (activation function-1).

ATP: trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate).

Cyt c: citocromo c.

DD: dominio de muerte (death domain).

DBD: dominio de unión a ADN (DNA binding domain).

DED: dominio ejecutor de muerte (death execution domain).

LBD: dominio de unión a ligando (ligand binding domain).

LC3: cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos (microtubule-associated protein 1 light-chain 3).

MCP: muerte celular programada.

MEF: fibroblastos embrionarios de ratón (mouse embryonic fibroblast).

MEF2: factor potenciador miocítico 2 (myocyte enhancer factor-2).

NBRE: elemento de respuesta a NGFI-B (nerve growth factor-induced gene-B response element).

NES: señal de exportación nuclear (nuclear export signal).

NGF: factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor).

NK<sub>1</sub>R: receptor de neurokinina-1 (neurokinine 1 receptor).

NLS: señal de localización nuclear (nuclear localization signal).

NR4A: familia de receptores nucleares 4A (nuclear receptors family 4 A).

NurRE: elemento de respuesta a Nur (Nur response element).

PE: fosfatidiletanolamina (phosphatidylethanolamine).

PI(3)K: fosfatidilinositol 3-OH cinasa.

PML: proteína de leucemia promielocítica (promyelocytic leukemia).

PML NBs: cuerpos nucleares de proteína promielocítica (promyelocytic leukemia nuclear bodies).

PT: transición de permeabilidad (permeability transition).

PtdIns(3)P: fosfoinosítidos 3-fosfato (phospho inositides 3-phosphate).

PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>: fosfoinosítidos 3,5-bisfosfato (phospho inositides (3,5)biphosphate).

RA: ácido retinoico (retinoic acid).

RanGAP1: proteína activadora de la GTPasa Ran (Ran GTPase activating protein 1).

RB: proteína de retinoblastoma (retinoblastoma protein).

RE: retículo endoplásmico.

RER: retículo endoplásmico rugoso.

RXR: receptor retinoide X (retinoid X receptor).

SP: sustancia P.

SUMO: modificador pequeño similar a ubiquitina (small ubiquitin-like modifier).

TCR: receptor de células T (T cell receptor).

TPA: éster de forbol (12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate).

TNF: factor de necrosis tumoral (tumoral necrosis factor).

TNF-R: receptor similar al factor de necrosis tumoral (tumoral necrosis factor-like receptor).

Ubl: similar a ubiquitina (Ubiquitin like).

z-VAD: pan-inhibidor de caspasas (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone).



## II. RESUMEN

La muerte apoptótica ha sido considerada clásicamente como sinónimo de muerte celular programada; sin embargo, existen tipos de muerte alternativos cuya morfología es caracterizada por la formación de vesículas. Las formas de muerte celular programada no apoptótica han sido observadas durante el desarrollo embrionario y en padecimientos neurodegenerativos; como es el caso de la muerte autofágica. En la muerte autofágica no hay activación de caspasas, pero sí la participación de una familia de genes que regulan la formación de las vesículas autofágicas. Tanto en células neuronales como no neuronales, el neuropéptido conocido como sustancia P al unirse a su receptor (NK<sub>1</sub>R), desencadena una vía de señalización en la que participan Arrestina-2, Raf-1, MEK2, ERK2 y Nur77 que culmina con la muerte de tipo autofágica.

Nur77 es un factor de transcripción implicado en diversos procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación, la muerte celular y en algunos casos incluso promueve la sobrevivencia. Las modificaciones postraduccionales de Nur77 como fosforilaciones, junto con su localización subcelular, son determinantes para la actividad que desempeña en distintos contextos biológicos. En la muerte celular programada no apoptótica activada por SP/NK<sub>1</sub>R se ha demostrado la fosforilación y estabilización de Nur77.

La conjugación de SUMO es una modificación postraducciona que tiene el efecto de relocalizar, estabilizar e influir en la actividad transcripcional de sus moléculas blanco, entre otras funciones. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que el receptor nuclear Nur77 es sumoilado durante la muerte celular inducida por SP/NK<sub>1</sub>R y esta modificación modula su actividad. Es decir, una explicación de cómo este factor de transcripción interviene en procesos tan opuestos como la sobrevivencia y la muerte celular podría ser la modificación postraducciona de Nur77 con SUMO.

El objetivo general de este trabajo es determinar si Nur77 es sumoilado durante la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R. Inicialmente se analizó el estado de sumoilación de proteínas en general durante la muerte autofágica inducida por SP/NK<sub>1</sub>R y se encontró enriquecida la formación de conjugados de alto peso molecular con SUMO-2/-3. En cambio, se sugirió la desumoilación de proteínas inicialmente conjugadas a SUMO-1. A través de análisis bioinformáticos, se encontraron dos sitios consenso de sumoilación en la secuencia primaria de la proteína de Nur77, mostrando a las Lys102 y Lys577 como posibles sitios de sumoilación. Se comprobó experimentalmente que Nur77 se sumoilaba por SUMO-1 y SUMO-2/-3 tanto *in vitro* como en la muerte autofágica inducida por SP/NK<sub>1</sub>R. Se discuten las posibles implicaciones del hallazgo.

### III. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos, independientemente de sus características, tienen en común el hecho de cumplir un ciclo en el que nacen, crecen, se reproducen y mueren. Para que esto pueda llevarse a cabo normalmente, se dan numerosos procesos, entre los que la muerte celular es de suma importancia, ya que está presente durante el desarrollo embrionario, en el recambio celular a lo largo de toda la vida del individuo, en la regulación del sistema inmune, etc. (Kim *et al.*, 2003; revisado en Schwartzman y Cidlowski, 1993).

#### A. Tipos de muerte

Morfológicamente, durante mucho tiempo la muerte celular fue clasificada en necrótica y apoptótica. La muerte necrótica fue tomada como una forma desorganizada y accidental de morir de la célula, cuando ésta era sometida a un estímulo como el daño mecánico, hipertermia, isquemia, venenos metabólicos, hipoxia, etc. (revisado en Gozyacik y Kimchi, 2004; Schwartzman y Cidlowski, 1993).

Ahora se sabe, que en la muerte necrótica la célula no tiene oportunidad de reciclar componentes útiles, ya que la cantidad de ADN, ARN y proteínas disminuye rápidamente; los cambios morfológicos que se aprecian en el núcleo son pequeños, mientras que otros organelos son disueltos y la membrana plasmática se rompe. En este tipo de muerte no sólo se afecta a la célula directamente estimulada, sino que las células vecinas se dañan por la liberación de material citoplásmico de la célula necrótica al momento de romperse su membrana. La membrana de los lisosomas de las células necróticas se rompe y consecuentemente se liberan hidrolasas, lo que ocasiona reacciones inflamatorias en el tejido (revisado en Schwartzman y Cidlowski, 1993).

Por otro lado, la célula puede estar "programada para morir", lo cual ocurre sin afectar al tejido circundante. Es por ello que durante la muerte apoptótica se rompen las uniones con las células vecinas y se forman cuerpos apoptóticos que serán degradados rápidamente por el sistema inmune o por las células vecinas, sin afectar al medio que les rodea (revisado en Schwartzman y Cidlowski, 1993).

Con el paso del tiempo, se ha trabajado más profundamente en la caracterización morfológica y bioquímica de la apoptosis. Entre las características morfológicas de las células apoptóticas, independientemente de cuál sea la vía por la que se inicie la muerte, están la translocación de fosfatidilserina a la capa externa de la membrana plasmática, la fragmentación de ADN en múltiplos de 180-200 pb., etc. (revisado de Schwartzman y Cidlowski, 1993). La caracterización bioquímica ha llevado al reconocimiento de dos vías alternativas para su activación, la vía extrínseca y la vía intrínseca.

En la vía extrínseca o mediada por receptores de muerte, participa la superfamilia de receptores tipo TNF-R. Estos receptores tiene en común un dominio intracelular conocido como dominio de muerte (DD, por sus siglas en inglés) encargado de reclutar moléculas adaptadoras, después de la unión del ligando. Las moléculas adaptadoras, además del DD, presentan un dominio ejecutor de muerte (DED, por sus siglas en inglés), con el cual ayudan a reclutar a las pro-caspasas iniciadoras (pro-caspasa 8, por ejemplo), las cuales

activan a las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7) (revisado en Malaguarnera, 2004) encargadas de la degradación y reorganización de diversas estructuras celulares. Diversas cascadas de señalización simultáneas llevan a la transcripción de genes cuyos productos también pueden participar en el proceso de muerte, como la poliubiquitina, cadmodulina o c-jun, entre otros (revisado en Schwartzman y Cidlowski, 1993).

La vía intrínseca o mitocondrial inicia con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial al insertarse Bax en la membrana mitocondrial, lo que se conoce como transición de permeabilidad (PT, por sus siglas en inglés) (revisado en Ferri y Kroemer, 2001); esto resulta en la apertura de poros y la liberación de proteínas como el citocromo c (Cyt c), del espacio intermembranal al citosol. Una vez en el citosol, el Cyt c interactúa con una molécula adaptadora, Apaf-1, favoreciendo su oligomerización; Apaf-1 más tarde, en forma de oligómero recluta a la procaspasa 9 y junto con el Cyt c forma lo que es conocido como apoptosoma, donde se activa la caspasa 9. La activación y liberación de la caspasa 9 del apoptosoma es seguida por la activación de las caspasas ejecutoras, 3 y 7 (revisado en Green, 2005), principales responsables de la ejecución de la muerte celular.

Las caspasas son enzimas fundamentales en las vías apoptóticas, ya que son las encargadas de importantes degradaciones y reorganizaciones en las células en proceso de muerte, como la destrucción de las interacciones célula-célula, la reorganización del citoesqueleto, la inhibición de la reparación y síntesis del ADN, la degradación del ADN y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos (revisado en Green, 2005).

Otro grupo de proteínas muy importante relacionadas con la vía mitocondrial es la familia Bcl-2. Algunos miembros de la familia Bcl-2 tienen actividad anti-apoptótica y otros pro-apoptótica. De acuerdo a su proporción, pueden evitar o inducir la apoptosis (revisado en Hengartner, 2000; Malaguarnera, 2004).

De manera relativamente reciente, se ha observado muerte en la que la célula juega un papel activo de manera similar a lo que ocurre en la apoptosis, pero morfológicamente es más similar a la necrosis. Durante el desarrollo embrionario se observan dos tipos de muerte distintos a la apoptosis: la muerte celular tipo II o autofágica y la muerte tipo III o citoplásmica (revisado en Gozyacik y Kimchi, 2004). Las características de cada tipo de muerte se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Principales tipos de muerte descritos durante el desarrollo\*

Tipo de muerte	Cambios nucleares	Cambios membranales	Cambios citoplásmicos	Eliminación heterofágica	Ejemplo
Tipo I o apoptosis	Condensación pronunciada de cromatina.	Burbujeo.	Pérdida de ribosomas del RER y polirribosomas Reducción en volumen Compactación de organelos.	Prominente e importante.	Cresta del ectodermo apical.
Tipo II o autofágica	Picnosis temprana, en algunos casos, no prevalece como en apoptosis. Partes del núcleo pueden brotar o segregarse.	Endocitosis en algunos casos Puede ocurrir burbujeo.	Vacuolas autofágicas abundantes. Mitocondrias y RER algunas veces dilatados. Golgi siempre alargado al ser fuente de lisosomas.	Ocasionalmente y tardío.	Placas epiteliales al cierre del paladar.
Tipo III o vesiculada no lisosomal	A Vacuolación tardía y posterior desintegración.	Se rompe.	Desintegración general Dilatación de organelos Espacios vacíos que ese fusionan entre sí.	No.	Cartilago, durante mineralización.
	B Incremento tardío en granulación de cromatina. Degeneración nuclear.	Redondeo celular. Retracción de la membrana.	Dilatación de RE, membrana nuclear, Golgi y ocasionalmente mitocondria. Espacios vacíos que se fusionan entre sí.	Si	¿?

\* Tomada y modificada de Clarke, 1990.

En las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica, se pierden grupos específicos de neuronas de acuerdo al padecimiento. Por ejemplo, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en Parkinson, cuya muerte tiene una morfología diferente a la apoptótica y más similar a la muerte autofágica o citoplásmica (revisado en Turmaine *et al.*, 2000).

La descripción de nuevos tipos de muerte celular que comparten características tanto con la apoptosis como con la necrosis, ha llevado a reconsiderar la clasificación de la muerte celular y dejar de ver a la apoptosis como sinónimo de muerte celular programada. Hay gran interés en ampliar el conocimiento de los elementos que forman parte de ellas, debido a su posible implicación en patologías.

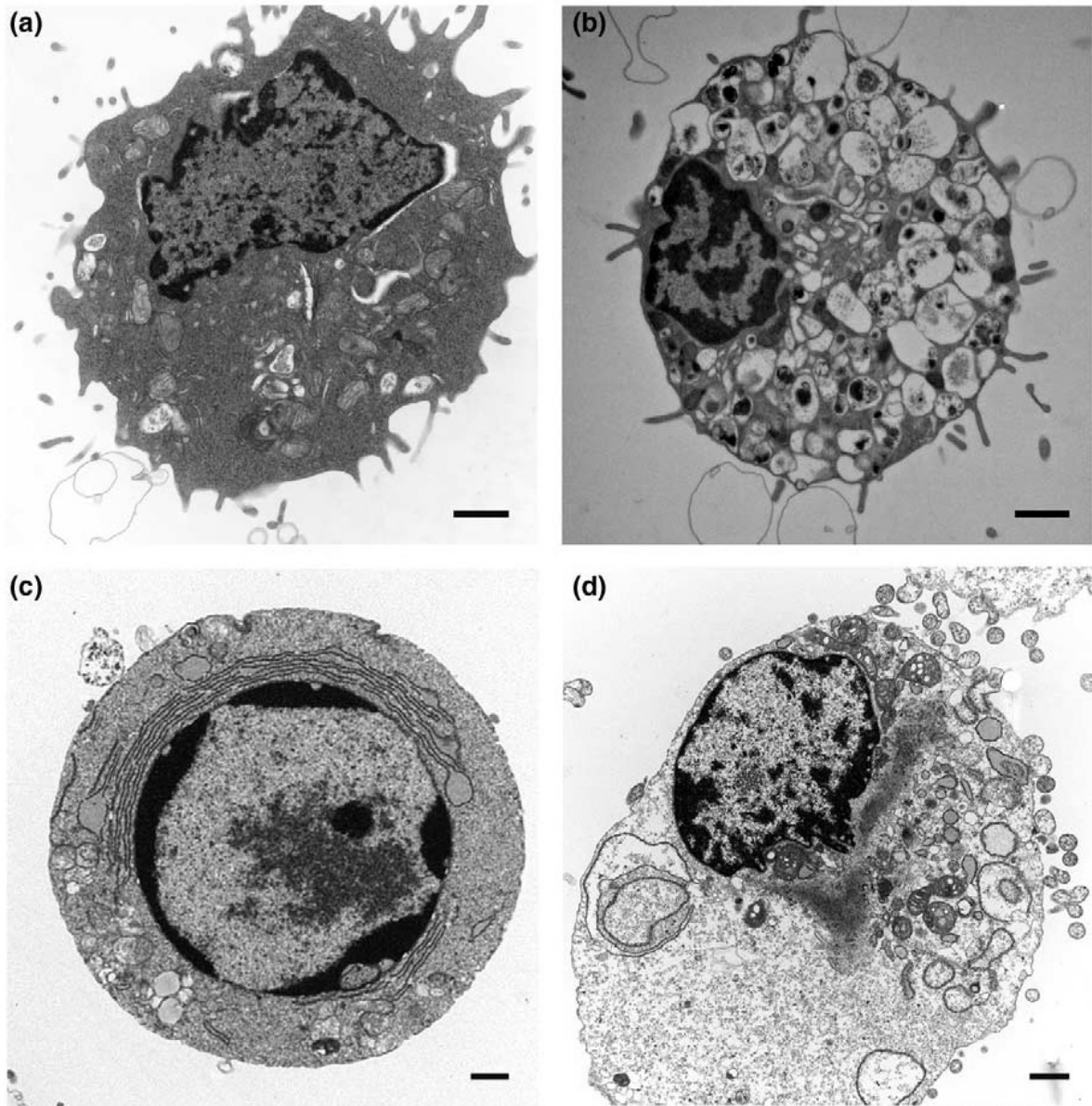
La razón más relevante para caracterizar las formas de muerte celular no apoptótica es el hecho de que la esperanza de vida de los seres humanos ha aumentado, lo que es evidente al observar cómo ha incrementado a nivel mundial la proporción de gente con edad avanzada. Las enfermedades degenerativas, en general, son más frecuentes en adultos mayores que en el resto de la población; por lo tanto, la caracterización de las formas alternativas de muerte permitiría generar fármacos para mejorar la calidad de vida de gente con éstas u otras patologías.

## B. Muerte celular autofágica

La autofagia como proceso catabólico es el mecanismo por el cual se eliminan las proteínas de vida media larga, organelos citoplásmicos disfuncionales o se obtienen macromoléculas necesarias para sobrevivir en condiciones de inanición. Sin embargo, las características morfológicas de la autofagia se han observado en la muerte celular de tejidos carentes de hormonas y enfermedades neurodegenerativas, así como en algunas formas de miopatías (revisado en Gozyacik y Kimchi, 2004; Tsujimoto y Schimizu, 2005).

Existen distintos tipos de autofagia: la macroautofagia degrada grandes porciones citoplásmicas, incluyendo organelos completos; la microautofagia degrada porciones citoplásmicas pequeñas; la autofagia mediada por chaperonas degrada moléculas con la secuencia consenso KFERQ expuesta y la peroxifagia es específica para la degradación de peroxisomas (revisado en Cuervo, 2004). La forma de autofagia observada en la muerte tipo II es macroautofágica. Para los propósitos de este trabajo sólo se trata sobre la macroautofagia, al ser el tipo de autofagia involucrado tanto en la muerte como en la sobrevivencia celular.

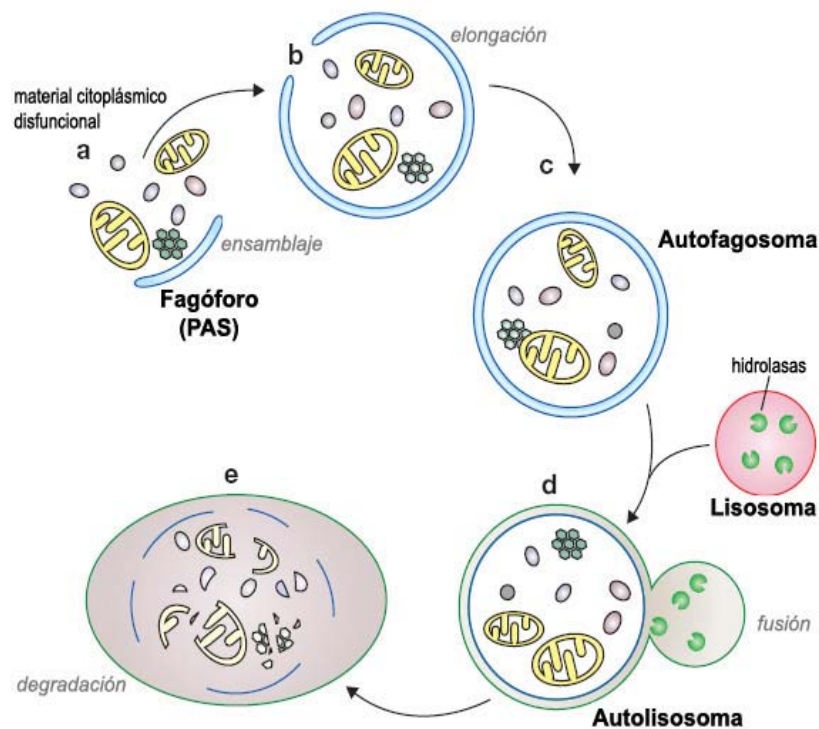
La característica principal de la autofagia es la presencia de vesículas citoplásmicas de doble membrana, llamadas autofagosomas, observadas en la muerte tipo II o autofágica. Otras características morfológicas en este tipo de muerte son en algunos casos la dilatación de mitocondrias y retículo endoplásmico, picnosis temprana ocasional, no hay fragmentación celular y en común con la apoptosis se observa ocasionalmente burbujeo de la membrana (Xu *et al.*, 2006; revisado en Gozyacik y Kimchi, 2004) (Figura 1).



Current Opinion in Cell Biology

**Figura 1. Morfología de células muriendo.** a) Célula viva. b) Célula autofágica con citoplasma altamente vacuolado y membrana plasmática íntegra. c) Célula apoptótica con cromatina altamente condensada e íntegridad en la membrana plasmática. d) Célula necrótica con liberación evidente de material citoplásmico al medio extracelular (tomado de Edinger y Thompson, 2004).

Los autofagosomas o vesículas de doble membrana, se fusionan con los endosomas tardíos o lisosomas, dan lugar a los autolisosomas donde las hidrolasas lisosomales digieren la porción citoplásmica secuestrada por el autofagosoma, junto con la membrana interna del ahora autolisosoma (revisado en Cuervo, 2004; Gozacik y Kimchi, 2004; Tsujimoto y Schimizu, 2005) (Figura 2).

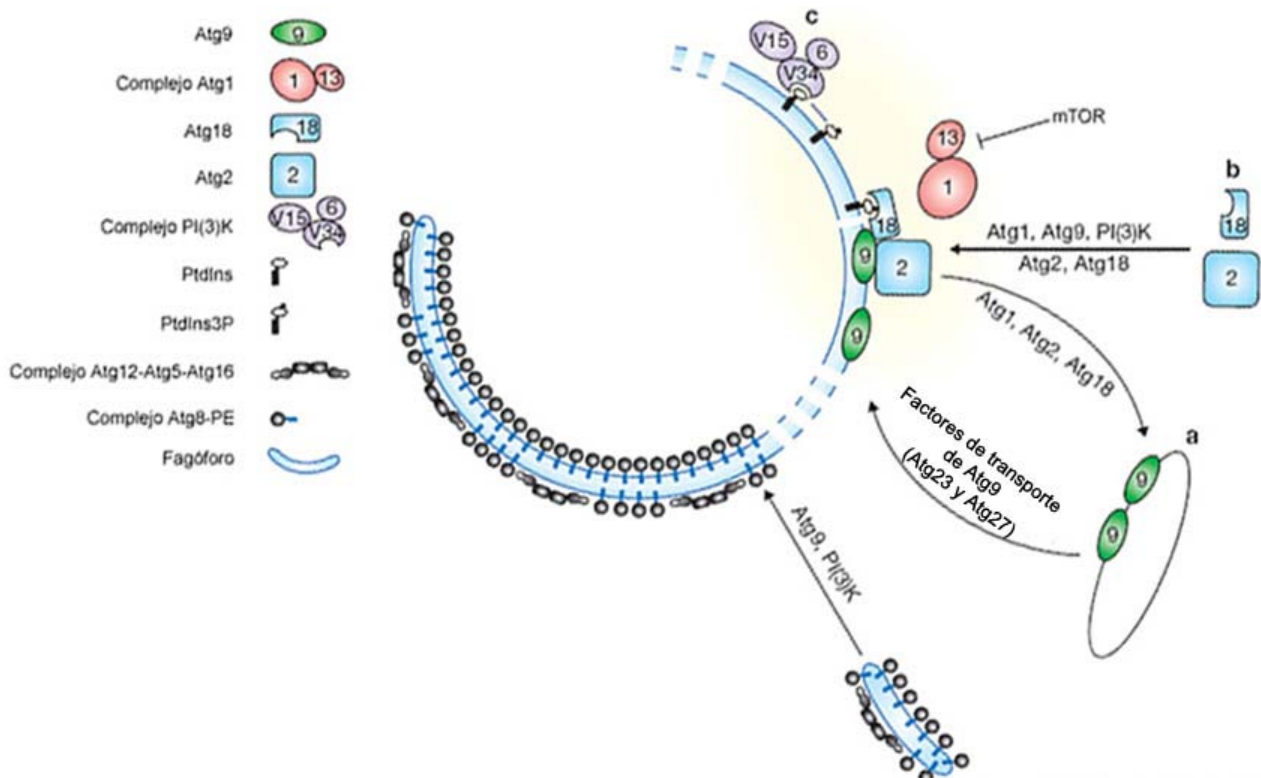


**Figura 2. Esquematización general de la autofagia.** a) Ensamblaje de la maquinaria autofágica y secuestro de material citoplásmico disfuncional, b) Elongación de la membrana precursora (fagóforo), c) Término de la formación de la vesícula de doble membrana, llamada autofagosoma, d) Formación del autolisosoma a partir de la fusión del autofagosoma y lisosoma, e) Degradación hidrolítica del material secuestrado (tomado de Xie y Klionsky, 2007).

El autofagosoma es el resultado de la elongación de una estructura membranosa llamada fagóforo. Los fagóforos (en mamíferos) o preautofagosomas (en levaduras), están presentes en el citoplasma de forma constitutiva; su elongación es requerida para alcanzar las proporciones necesarias y así engullir regiones citoplásmicas, durante la autofagia. La elongación de fagóforo a autofagosoma requieren del núcleo de la maquinaria autofágica, un conjunto de genes denominados Atg o relacionados con autofagia, los cuales se encuentran conservados desde las levaduras hasta los mamíferos; su caracterización principalmente se ha llevado a cabo en *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) aunque recientemente se han identificado homólogos en otras especies. El núcleo de la maquinaria autofágica consiste en tres grandes grupos funcionales: *Atg9* (*Atg9*, *Atg1-Atg13*, *Atg2* y *Atg18*), *PI(3)K* (*Vps34*, *Vps15*, *Atg6/Vsp30/Beclina I* y *Atg14*) y *Ubl* (revisado en Gozyacik y Kimchi, 2004; Xie y Klionsky, 2007).

*Atg9* es una proteína central de la maquinaria autofágica y es la más altamente conservada entre especies (levadura, *Xenopus*, ratón y humano). En levadura se le ha ubicado en la mitocondria, mientras que en mamíferos se localiza en trans-Golgi y endosomas tardíos, pero no en la mitocondria. La localización de *Atg9* en la periferia del fagóforo, donde permanece hasta antes del cierre del autofagosoma, requiere de *Atg23* y *Atg27*. En el fagóforo, *Atg9* interactúa con *Atg18* y *Atg2*, y posteriormente *Atg9* deja el fagóforo. *Atg18* puede unir los fosfoinosítidos  $\text{PtdIns}(3)\text{P}$  y  $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$  de los cuales los  $\text{PtdIns}(3)\text{P}$  son necesarios para la

autofagia. Las proteínas Atg1 y Atg13 regulan la magnitud autofágica al participar en el proceso de reciclaje de Atg9 (revisado en Xie y Klionsky, 2007) (Figura 3a).



**Figura 3. Elongación de fagóforo.** a) El ciclo de Atg9 es necesario para la elongación del fagóforo, la translocación de Atg9 al fagóforo requiere de Atg23 y Atg27, mientras que en el reciclaje participa el complejo de Atg1, Atg2 y Atg18. b) La localización de Atg2 y Atg18 en el fagóforo requiere de Atg9, además de los complejos Atg1 y PI(3)K; Atg18 une PtdIns(3)P; la formación del complejo Atg1 (Atg1-Atg13) es inhibido por hiperfosforilación por mTOR. c) El complejo PI(3)K incluye a Vps34, Vps15 y Atg6. La presencia de Atg9 y el complejo PI(3)K en el fagóforo es necesaria para la localización de los dos complejos similares a ubiquitina (tomado de Xie y Klionsky, 2007).

El complejo fosfatidilinositol 3-OH cinasa (PI(3)K) es necesario para el reclutamiento de proteínas de unión a PtdIns(3)P, como es el caso de Atg18. Vps34, la única cinasa fosfatidilinositol 3 tipo III (PI3-K tipo III) descrita en mamíferos, se asocia con Vps30/Atg6 (en levadura)/Beclina I (en humano) y la adaptadora Vps15, que al interactuar con Vps14 regulan la autofagia. Beclina I se localiza en trans-Golgi, retículo endoplásmico, mitocondria y membrana perinuclear; para translocarse al fagóforo requiere de Vps14. En el fagóforo Beclina I es esencial para el reclutamiento de otras proteínas Atg y la producción de PtdIns(3)P (revisado en Patingre *et al.*, 2008; Xie y Klionsky, 2007) (Figura 3c).

El tercer complejo consiste en dos grupos de proteínas que son activadas de manera similar al proceso de ubiquitinación (Ubl, por sus siglas en inglés). Atg8/LC3, es procesado en su extremo C-terminal por Atg4 para dejar expuesto un residuo de Gly (forma LC3-I) a través del cual se conjuga a una molécula blanco de fosfatidiletanolamina (PE, por sus siglas en inglés). Atg7 funge como enzima similar a E1 y activa a Atg8 que con ayuda de Atg3 es conjugada a la PE; este heterodímero no tiene preferencia por la cara externa



o interna de fagóforo. PE produce un cambio conformacional en LC3 (forma LC3-II), necesario para su unión al fagóforo. Atg8-PE son importantes para el reclutamiento de Atg12-Atg5-Atg16 en el fagóforo (revisado en Cuervo, 2004; Ferraro y Cecconi, 2007; Gozyacik y Kimchi, 2004; Xie y Klionsky, 2007) (Figura 4).

En el otro sistema de conjugación Ubl participa Atg12. No se conoce que Atg12 sea procesado previamente a su activación, pero participa la misma enzima activadora similar a E1 (Atg7) que en el sistema Ubl anterior. Una vez activado, Atg12 es conjugado a su blanco, Atg5, con la ayuda de Atg10 (E2); al formarse el dímero Atg12-Atg5, se une Atg16 a Atg5 y se oligomeriza. El complejo Atg12-Atg5-Atg16 se ubica en la cara externa del fagóforo y es liberado al formarse el autofagosoma, mientras que el dímero Atg8-PE en la cara externa del fagóforo es removido justo antes de la fusión con el lisosoma. Los dímeros Atg8-PE ubicados en el interior del autofagosoma son degradados en el lumen lisosomal (revisado en Ferraro y Cecconi, 2007; Xie y Klionsky, 2007) (Figura 4).

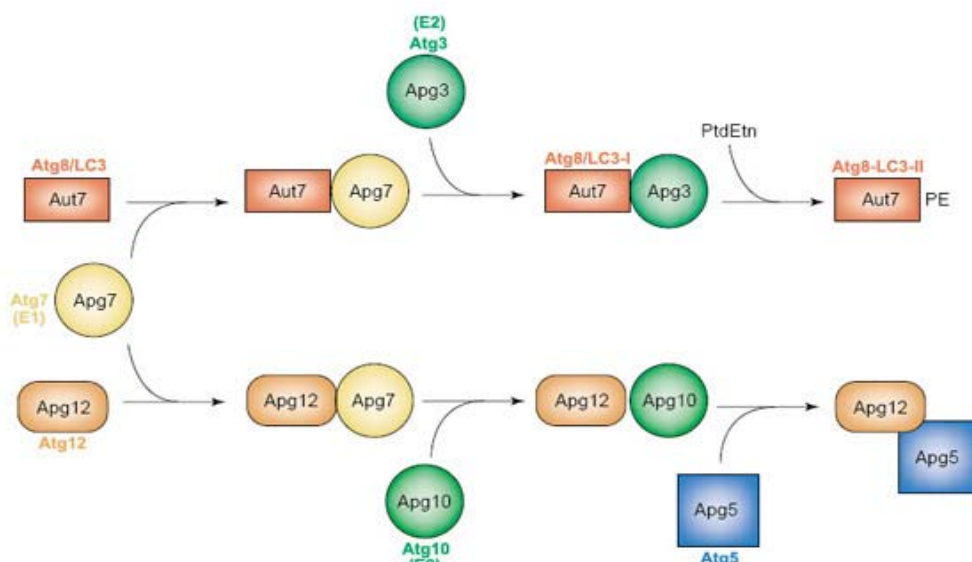


Figura 4. Sistemas de expansión Ubl de las vesículas autofágicas. Las moléculas nombradas como Apg y Aut hacen referencia a la nomenclatura para levadura; Atg (fuera de las figuras) hace referencia a la nomenclatura actual que unifica las anteriores (tomado de Schwartz y Hochstreser, 2003).

La autofagia se activa en diferentes condiciones, entre ellas la carencia de elementos esenciales como los aminoácidos y ATP. La cinasa Tor es un sensor de nutrientes que se mantiene activa mientras la célula cuenta con nutrimentos e inhibe la maquinaria autofágica hiperfosforilando a Atg13, lo que evita su asociación con Atg1. En condiciones de inanición se evita la hiperfosforilación de Atg13, incrementando su afinidad por Atg1, además de haber sobre-expresión de Atg8 independientemente de la vías de Tor (revisado en Gozyacik y Kimchi, 2004; Pattingre *et al.*, 2008) (Figura 3b). El incremento de niveles de glucocorticoides y hormonas tiroideas, la hipoxia y las altas temperaturas también estimulan la autofagia (revisado en Cuervo, 2004; Tsujimoto y Schimizu, 2005).

Durante el desarrollo existen ejemplos en los que se ha observado muerte celular con características autofágicas (Tabla 2). También en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por sus siglas en inglés)

deficientes en Bax/Bak ante agentes genotóxicos como etoposide, estaurosporina y taspigargina (revisado en Tsujimoto y Schimizu, 2005); en macrófagos activados con LPS y cuya apoptosis ha sido bloqueada (inhibidores de caspasas, z-VAD) (Xu *et al.* 2006), etc. Los últimos ejemplos mencionados, entre otros, indican una conexión importante entre la muerte apoptótica y la muerte autofágica, pues en estos casos la ausencia de apoptosis induce la activación de la autofagia. Sin embargo, la muerte autofágica y apoptótica no necesariamente son excluyentes entre sí, pues se han observado ambos tipos de muerte en el mismo tejido e incluso hay casos en los que primero se da un mecanismo para que posteriormente se dé el otro dentro de la misma célula (revisado en Gozyacik y Kimchi, 2004).

Tabla 2. Ejemplos de muerte tipo II o autofágica en el desarrollo normal*		
Estructura	Especies	Referencia
Glándulas salivares	Larva de moscas	Schin y Clever (1965, 1968)
Cola	Anfibio metamórfico	Fox (1973)
Branquias externas	Larva de anfibio	Michaels <i>et al.</i> , (1971)
Epitelio del paladar durante el cierre	Ratón, embriones de rata	Farbman (1968) Smiley y Dixon (1968)
Epitelio de ductos Müllerianos	Embrión de pollo	Scheib (1965, 1977)
Neuronas del istmo del núcleo óptico	Embrión de pollo	Clarke (1984)
Mesonéfrros	Embrión de pollo	Salzgeber y Weber (1966)

\* Tomada y modificada de Clarke, 1990.

La autofagia parece ser un mecanismo importante para evitar el surgimiento de tumores, pues se ha detectado la delección del *locus* de Beclina I en el 75% de los cánceres de ovario, en el 50% de seno y 40% de próstata. En el cáncer de ovario, seno y colon, ante radiación se indujo autofagia (revisado en Gozyacik y Kimchi, 2004). Además, se ha observado la inducción de muerte autofágica ante estrés oxidativo en las líneas HeLa, HEK293 y U87, todas transformadas (Chen *et al.*, 2007) y no en cultivos primarios, esto puede ofrecer una alternativa anticancerígena.

Sin embargo, la autofagia no siempre favorece la muerte celular. Al contrario, puede favorecer la sobrevivencia evitando la acumulación de materiales dañinos para la célula, como proteínas mal plegadas u organelos disfuncionales. Las enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer, Parkinson y Huntington parecen ser favorecidas por deficiencias en la autofagia. En la enfermedad de Alzheimer hay disminución de la  $\beta$ -amelioidogénesis al bloquearse la formación de vesículas autofágicas; en Parkinson, las neuronas dopaminérgicas afectadas presentan acumulación de  $\alpha$ -sinucleina, la cual normalmente es degradada mediante autofagia. La enfermedad de Huntington es causada por la presencia de la forma mutante de la proteína huntingtina, la cual también es degradada por la autofagia y al fallar el proceso esto puede causar su acumulación en neuronas (revisado en Takács-Vellai *et al.*, 2006). En los ratones con mutaciones nulas para Atg5 o Atg7 se observa la acumulación de inclusiones citoplásmicas en neuronas, no vistas en ratones silvestres, asociadas a problemas motores y de comportamiento que incrementan con la edad, lo que lleva a la muerte de los ratones a las 28 semanas posnatales (Hara *et al.*, 2006 y Komatsu *et al.*, 2006).

Como puede apreciarse, hay ejemplos de la participación de la autofagia tanto en mecanismos de sobrevivencia como de muerte, por eso para algunos grupos de investigación resulta controversial el papel real que desempeña. Su participación en sobrevivencia no necesariamente debe excluir su implicación en la muerte celular y viceversa, este proceso puede tratarse de uno más en los que el contexto celular es determinante. Es posible que favorezca la sobrevivencia evitando la acumulación de materiales dañados como proteínas mal plegadas u organelos, pero que provoque la muerte celular al degradar un exceso de material citoplásmico. Dependiendo del contexto celular sucedería una cosa u otra.

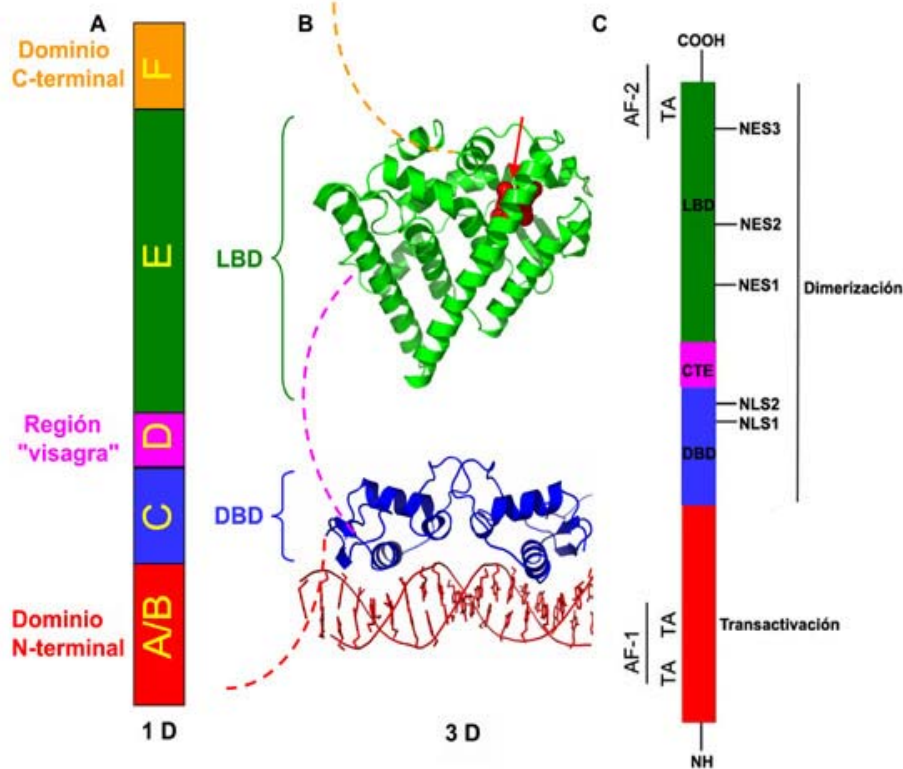
Un modelo que ha permitido el estudio de la autofagia dentro de un contexto de muerte, es el iniciado por la sustancia P y el receptor de neurokinina-1, que se describe más adelante. La interacción de estas moléculas desencadena una cascada de señalización en la que se activa el receptor nuclear Nur77, cuya actividad es necesaria para que culmine la muerte tipo II o autofágica.

### C. Nur77, receptor nuclear implicado en muerte celular.

El receptor nuclear Nur77, también conocido como TR3, NGFI-B $\alpha$ , NR4A1, etc., es una fosfoproteína de entre 65 y 75 KDa, cuya expresión es controlada por estímulos externos, como factores de crecimiento (revisado en Laudet, 2005). Nur77 carece de ligando identificado aunque posiblemente no lo requiere, al plegamiento que presenta su dominio de unión a ligando. Por ello, es considerado un receptor nuclear huérfano (revisado en Hsu *et al.*, 2004 y Léséleuc *et al.*, 2006).

La subfamilia de que Nur77 está integrada por tres miembros: Nur77, Nurr1 y Nor-1, cada quien con un patrón de expresión diferente, aunque en el adulto el timo y la glándula pituitaria expresan las tres moléculas; Nur77 comparte con Nurr1 el hígado y con Nor-1 las glándulas adrenales. Individualmente, Nur77 además se expresa en el músculo, el pulmón, la próstata ventral, la glándula tiroidea, el ovario y el testículo; Nurr1 se expresa en el cerebro y los osteoblastos, de hecho está implicado en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas. Nor-1 se expresa en el riñón, el corazón, y el músculo esquelético (revisado en Hsu *et al.*, 2004; Susuki *et al.*, 2003).

Estructuralmente, Nur77 posee los dominios presentes en el resto de los receptores nucleares: un dominio de activación variable (AF1) N-terminal, un dominios de unión a ADN (DBD) altamente conservado y el dominio de unión a ligando (LBD) medianamente conservado (revisado en Glass y Ogawa, 2006) (**Figura 5**).



**Figura 5. Organización estructural de los receptores nucleares.** A-B, estructura general de los receptores nucleares clásicos, A. Estructura primaria, B. estructura terciaria. C, estructura primaria de Nur77. Abreviaturas: DBD, DNA binding domain; LBD, ligand binding domain; AF-1, activation factor-1; NLS, Nuclear localization signal; CTE, region constant, NES, nuclear exportation signal, AF-2, activation factor-2. A y B, tomados y modificados de Wikipedia (2008). C, tomado y modificado de Hsu *et al.*, 2004.

El DBD es central y característico de la subfamilia NR4A, con una homología del 90% entre los tres miembros (revisado en Hsu *et al.*, 2004; Winoto y Littman, 2002); comprende dos señales de localización nuclear (NLSs), además de dos módulos y en cada uno contiene cuatro motivos cisteína/zinc. En general, el DBD es importante para la dimerización, como típicamente se unen los receptores nucleares clásicos; pero además, los miembros de la subfamilia NR4A pueden unirse como monómeros a la secuencia NBRE (elemento de respuesta a NGFI-B, AAAGGTCA) u homo o heterodímeros a la secuencia NurRE (elemento de respuesta a Nur, TGATATTTX<sub>6</sub>AAATGCCA) (revisado en Glass y Ogawa, 2006; Hsu *et al.*, 2004; Winoto y Littman, 2002).

El dominio de unión a ligando o LBD C-terminal posee señales de exportación nuclear (NESs, por sus siglas en inglés), asociadas a la translocación desde el núcleo al citoplasma inducida por el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) (revisado en Hsu *et al.*, 2004; Laudet, 2005). Los receptores clásicos, no huérfanos, son activados cuando el ligando se une al LBD, por lo que el LBD se ha implicado con la regulación transcripcional (revisado en Glass y Ogawa, 2006; Hsu *et al.*, 2004; Laudet, 2005; Winoto y Littman, 2002). Estudios de cristalografía del LBD de Nurr1 sugieren que esta subfamilia de receptores huérfanos podrían haber evolucionado de manera que dejaran de requerir un ligando, ya que el

LBD está plegado de tal manera que no hay cabida para una molécula que funja como ligando, más bien, este espacio es ocupado por residuos hidrofóbicos que estabilizan la estructura (Wang *et al.*, 2003).

La fosforilación de Nur77 regula su actividad transcripcional. Las fosforilaciones de Nur77 pueden ser llevada a cabo por diferentes cinasas, como Akt, que fosforila a Nur77 en la Ser350, dentro del DBD; esta fosforilación induce la asociación de Nur77 con las proteínas 14-3-3 quienes lo secuestran y evitan su unión al ADN, con lo que inhiben su función pro-apoptótica (Masuyama *et al.*, 2001). Otra cinasa conocida para Nur77 es ERK2 que fosforila la Thr142 de Nur77 en células PC12 estimuladas NGF (Slagsvold *et al.*, 2002). En la **Tabla 3** se resumen algunas de las cinasas identificadas hasta el momento.

**Tabla 3. Algunas fosforilaciones de Nur77**

<i>Estímulo</i>	<i>Línea celular</i>	<i>Residuo fosforilado</i>	<i>Localización intracelular</i>	<i>Efecto</i>	<i>Fuente</i>
TPA	COS-1	Ser354, por pp90 <sup>rsk</sup>	-	Posible control de unión a ADN y/o localización nuclear.	Davis <i>et al.</i> , 1993.
TCR	293T DO11.10	Ser350, por Akt	-	Asociación a proteínas 14-3-3 e inhibición de función apoptótica	Masuyama <i>et al.</i> , 2001.
NGF	PC12	Thr142, por ERK2	-	inhibición de función apoptótica	Slagsvold <i>et al.</i> , 2002.
	PC12	Ser105	Translocación citoplásmica de heterodímero RXR-Nur77	Reducción de interacción RA-RXR e inhibición de transcripción dependiente de la interacción	Katagiri <i>et al.</i> , 2000.
SP	Cultivos primarios neuronales y HEK293T	posiblemente por ERK2	-	Inducción de muerte celular programada no apoptótica	Castro-obregón <i>et al.</i> , 2004.

Se han visto varios casos en los que Nur77 está asociado a la muerte celular, aunque en la mayoría son de tipo apoptótico. La sobre-expresión de Nur77 en linfocitos T y B posterior a la unión del antígeno al receptor induce apoptosis, como también ocurre ante lesiones mecánicas y en células T al estimularlas con ésteres de forbol y ionomicina (revisado en Hsu *et al.*, 2004; Winoto y Littman, 2002). Ajeno a su actividad transcripcional, la translocación de Nur77 a la mitocondria ante estímulos como ésteres de forbol, retinoides, ionóforos de calcio y etoposide, en células LNCaP favorece la liberación de citocromo c al citoplasma que culmina en apoptosis (Li *et al.*, 2000).

Nur77 también promueve la apoptosis al interactuar con p53, factor de transcripción y supresor de tumores. La interacción Nur77-p53 lleva a la inhibición de la actividad transcripcional de p53 y consecuentemente disminuye la transcripción de Mdm2, E3 ubiquitin-ligasa de p53. Esto estabiliza a p53 y favorece la muerte apoptótica ante radiación UV (Zhao *et al.*, 2006).

Por el contrario, en otros modelos, Nur77 puede ser también una proteína que promueve sobrevivencia. En MEFs sensibles a TNF (RelA<sup>-/-</sup> y TRF2<sup>-/-</sup>), pareciera ser requerida la actividad transcripcional de Nur77, pues la sobre-expresión de Nur77 disminuye la activación de la caspasa 8 y consecuentemente de la caspasa 3 (ejecutora), lo que protege del efecto apoptótico de TNF $\alpha$  (Susuki *et al.*,

2003). Por otro lado, en la línea celular H460, la expresión ectópica de Nur77 provoca la aceleración de la progresión del ciclo celular y la proliferación (revisado en Hsu *et al.*, 2004).

A los integrantes de la familia de Nur77 además se les ha involucrado en patologías como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, la depresión maniaca, el cáncer, la enfermedad autoinmune, etc. En el caso de la esquizofrenia y el desorden bipolar, por lo menos el 3% de los individuos presentan mutaciones en Nurr1 (revisado en Love, 2005). Respecto al cáncer se ha observado sobre-expresión de Nur77 (revisado en Hsu *et al.*, 2004).

El hecho de que la subfamilia NR4A y más específicamente Nur77, esté involucrada tanto en la proliferación como en la muerte parecería contradictorio, pero las diferentes funciones podrían regularse al modular su localización intracelular y su actividad, lo cual parece ser dependiente de modificaciones postraduccionales.

#### **D. Modificación postraducciona por SUMO**

La sumoilación es una modificación postraducciona que consiste en la conjugación de SUMO (small ubiquitin-like modifier; revisado en Seet *et al.*, 2006) a una molécula blanco que en su mayoría son proteínas nucleares (revisado en Müller *et al.*, 2001). SUMO es un péptido relacionado con la ubiquitina; sin embargo, su conjugación no está asociada a la degradación de proteínas como mayoritariamente sucede con la poli-ubiquitinación (revisado en Kim *et al.*, 2002) (**Tabla 4**).

Las proteínas similares a ubiquitina se dividen en modificadores similares a ubiquitina (UBLs) y en proteínas con dominio de ubiquitina; SUMO se ubica en el primer grupo. Dentro de los eucariontes, SUMO es una molécula conservada, ya que se ha identificado en levaduras, plantas y mamíferos. En los mamíferos, hay cuatro tipos de SUMO (SUMO-1, -2, -3 y -4), de los cuales el más estudiado es SUMO-1, una molécula de 101 aminoácidos, cuya similitud con SUMO-2 y -3 es sólo del 48%, mientras que la similitud entre SUMO-2 y -3 es del 95% (revisado en Kim *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001). De SUMO-4 se conoce muy poco; parece ser tejido-específico, más pequeño (95 aa.) y más similar estructuralmente a SUMO-2 que a cualquier otro; fisiológicamente se le ha asociado con la *Diabetes mellitus* al encontrarse un polimorfismo de este péptido en pacientes con dicho padecimiento (Bohren *et al.*, 2004; Owerbach *et al.*, 2005).

Tabla 4. Similitudes y diferencias entre Ubiquitina y SUMO-1*	
Ubiquitina	SUMO-1
18% de identidad entre sus secuencias	
Sintetizados como precursores, con extensión C-terminal	
Estructura 3-D similar, plegamiento globular compacto, con hojas-β alrededor de una hélice-α	
Mecanismo de conjugación similar, implica enzimas E1, E2 y E3.	
Similitud de E1 para ubiquitina con E1 para SUMO	
Péptido de 76 aminoácidos	Péptido de 101 aminoácidos
Degradación del sustrato	Estabilización y relocalización del sustrato
Enzima activadora E1 homodimérica	Enzima activadora E1 heterodimérica
Varias enzimas conjugadoras E2	Ubc9 como única enzima conjugadora E2, descrita
Carga positiva en ubiquitina, no interacciona con E2 para SUMO	Carga negativa de SUMO y positiva en E2
Enzima conjugadora E2 interactúa con enzima activadora E1	Enzima conjugadora E2 interactúa con sustrato
Enzima ligasa E3 interactúa con sustrato	Enzima ligasa E3 interactúa con enzima conjugadora E2
Enzima ligasa E3 indispensable para conjugación	Enzima ligasa E3 incrementa interacción con sustrato, pero no es indispensable <i>in vitro</i>
Enzima ligasa E3 responsable de especificidad	Enzima conjugadora E2 adjudicada como responsable de especificidad
Puede conjugarse como mono o poli-ubiquitina	Conjugación preferente como mono-SUMO para SUMO 1, poli-SUMO mayoritariamente para SUMO-2 y -3
Sin extensión N-terminal	Con extensión N-terminal flexible

\* Tomado a partir de Kerscher *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001; Seet *et al.*, 2006.

Tanto la ubiquitina como SUMO son sintetizados como precursores, con una extensión C-terminal que se debe cortar para su activación. Los residuos eliminados para la maduración en los distintos SUMOs son diferentes, hecho que es un punto de diferenciación para las enzimas encargadas de la maduración de los precursores (revisado en Mukhopadhyay y Dasso, 2007) (Figura 6). A diferencia de la ubiquitina, SUMO posee una extensión N-terminal flexible y aunque no se ha caracterizado su función, se le ha adjudicado importancia en la formación de cadenas de poli-SUMO en SUMO-2 y -3 (revisado en Kim *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001).

```

Smt3p      msdsevnqeakpevkp  evkpethinlkv  sdgsseiffkikktplrrlmeafakrggkemdslrflydgiriqadqtpedldmedndiieahreqigga ty
SUMO-1     msd      qeakpstedlgdkegeyiklvigqdssei hfkvmtthlklkesycqrqgvpmnsrlrfefegqriadnhtpkelgmeeedvievyqeqtgghstv
SUMO-2     mad      ekpkegvk      tennhinlkvaggdgsvvqfkikrhtplsklmkaycerqglsmrqirfrfdgppinetdtpaqlmededtidvfgqqtggvy
SUMO-3     mse      ekpkegvk      te ndhinlkvaggdgsvvqfkikrhtslsklmkaycerqglsmrqirfrfdgppinetdtpaqlrmededtidvfgqqtggvpesslaghsf
SUMO-4     man      ekpteevk      tennhinlkvaggdgsvvqfkikrhtplsklmkayceprglsvkqirfrfdgppisgtdkpaqlmededtidvfgqqtggvy

```

Figura 6. Alineamiento de las secuencias de los cuatro SUMOs descritos en mamíferos y el homólogo en levadura (Smt3p). Los residuos en azul indican aminoácidos diferenciales en el extremo C-terminal entre los distintos SUMOs, los residuos rojos indican las glicinas que quedan expuestas al procesarse los precursores, en morado se indican las lisinas blanco de sumoilación para la creación de cadenas de poli-sumo, el residuo verde indica la Pro en SUMO-4 que evitan su interacción con proteínas SENP (tomado de Mukhopadhyay y Dasso, 2007).

Existe una familia de proteasas específicas para SUMO llamadas SENPs (Ulp1 en *S. cerevisiae*) que divergen funcionalmente en dos grupos: aquel con similitud a Ulp1 (SENP1, SENP2, SENP3 y SENP5), importante para el procesamiento del péptido y el grupo con similitud a Ulp2 que parece ser más importante para la desumoilación del blanco modificado y sobretodo en el desmantelamiento de las cadenas de SUMO-2/3, como se explica más adelante (revisado en Hay, 2005; Mukhopadhyay y Dasso, 2007; Müller *et al.*, 2001). Particularmente, SUMO-4 presenta un residuo de prolina en la posición 90 que evita la interacción de las proteasas para su maduración y su desconjugación (Owerbach *et al.*, 2005).

El procesamiento o maduración del péptido es necesario para dejar expuesto un dímero de Gly, necesario para la formación del enlace isopeptídico entre el C-terminal de SUMO y el  $\epsilon$ -amino de la Lys en la proteína blanco; una vez procesado SUMO, entra a escena la enzima activadora o E1 compuesta del heterodímero SAE1-SAE2 en mamíferos (Aos-Uba2, homólogos en levadura), encargada de activar a SUMO (revisado en Müller *et al.*, 2001).

La activación de SUMO ocurre mediante la adenilación de su C-terminal utilizando ATP. La unión SUMO-ATP es atacada por el grupo sulfihídrido de la Cys en el sitio activo de SAE2. Al romperse el enlace covalente SUMO-AMP, se forma un enlace tioéster de alta energía entre el C-terminal de SUMO y la enzima E1, liberando AMP (revisado en Kim *et al.*, 2002; Hay, 2005; Müller *et al.*, 2001; Kerscher *et al.*, 2006). Aunque SAE2 es el monómero que posee la Cys necesaria para formar el enlace tioéster con SUMO, se requiere de ambas subunidades (SAE1-SAE2) para la activación de SUMO tanto *in vitro* como *in vivo* (revisado en Müller *et al.*, 2001).

Ya activado SUMO, la enzima E1 lo transfiere a la Cys en el sitio activo de la enzima conjugadora E2 (Ubc9) (revisado en Kerscher *et al.*, 2006). Hasta el momento se ha descrito una sola enzima E2 específica para SUMO (revisado en Müller *et al.*, 2001). A pesar de la similitud en la estructura tridimensional de SUMO y ubiquitina (revisado en Kim *et al.*, 2002), la E2 para SUMO no puede conjugar ubiquitina. La región de Ubc9 que interactúa con SUMO está cargada positivamente y la superficie de SUMO tiene carga negativa, lo cual favorece la interacción, mientras que la superficie de ubiquitina también está cargada positivamente, de manera que no puede interactuar con Ubc9 (revisado en Kim *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001) (**Figura 7**).

Ubc9 favorece la unión covalente de la proteína blanco con SUMO, al permitir que SUMO entre en contacto con el motivo consenso de sumoilación,  $\psi$ [I/V/L]KxE[D/E], del sustrato a sumoilar. La presencia de esta secuencia, no siempre permite predecir la Lys del blanco a la que se conjugará la molécula de SUMO (revisado en Kerscher *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2002), ya que es un motivo muy pequeño con altas probabilidades de estar presente incluso en proteínas que no son sumoiladas.



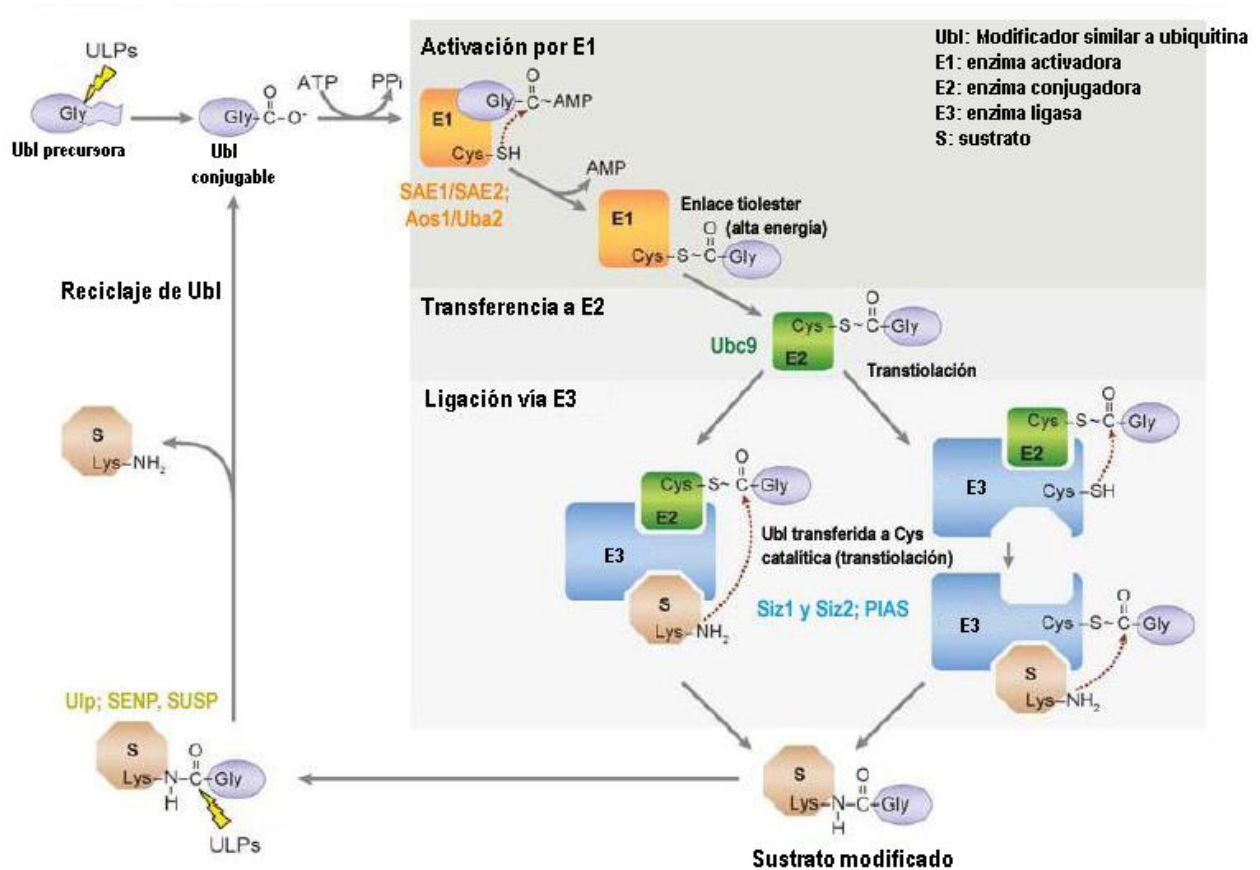


Figura 7. Proceso de conjugación general para Ubl; los nombres indicados de enzimas son específicos para SUMO (Tomada y modificada de Kerscher, 2006).

Mediante estudios *in vitro* se observó que altas concentraciones de SAE1-SAE2 y Ubc9 son suficientes para ligar SUMO a su molécula blanco, pues aparentemente la enzima E2 de SUMO tiene la capacidad de reconocer directamente a la proteína blanco sin necesidad de una enzima E3 ligasa de SUMO; sin embargo, la presencia de la E3 ligasa fortalece la interacción para que finalmente se dé un enlace isopeptídico entre SUMO y la proteína blanco (revisado en Hay, 2005; Kerscher *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2002). Se han descrito por lo menos dos enzimas E3 ligasas para SUMO en levadura (Siz1 y Siz2), mientras que en mamíferos se identificó a RanBP2 y varios miembros de la familia PIAS (revisado en Kim *et al.*, 2002).

Las enzimas E3 ligasas para SUMO más ampliamente descritas son los miembros de la familia PIAS, cuyo dominio necesario para ejercer esta función es denominado SP-RING, relacionado al dominio RING clásico presente en enzimas E3 ligasas para ubiquitina. Sin embargo, el dominio SP-RING carece del primer y tercer par de cisteínas-histidinas que forman uno de los dos sitios de unión a zinc en el dominio RING. Las proteínas PIAS originalmente fueron identificadas como inhibidores de los factores de transcripción STAT, de allí su nombre (revisado en Schmidt y Müller, 2003).

La sumoilación es un proceso reversible, ya que el sustrato que ha sido conjugado a SUMO, es susceptible de desumoilarse. La misma familia de enzimas encargadas del procesamiento del precursor incluye a las enzimas encargadas de llevar a cabo la desumoilación. Las proteínas desumoiladoras SUSPs o

SENPs en humanos así como Ulp2 en *S. cerevisiae* tienen en común una región de 200 aminoácidos (dominio ULP), donde se ubica la región catalítica; particularmente en el ratón conservan la triada catalítica His/Asp/Cys en el C-terminal, pero carecen de similitud en el N-terminal (revisado en Kim *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001).

No todas las proteasas SENP son específicas para SUMO, pues SENP8 es específica para Nedd8, otro Ubl. Aquellas que sí son específicas para SUMO tienen la capacidad de distinguir entre los distintos tipos de SUMO, teniendo preferencia sobre alguno. La molécula blanco también influye sobre la interacción con determinada enzima desumoiladora al ser permisiva o no para la interacción (Mikolajczyk *et al.*, 2007; revisado en Mukhopadhyay y Dasso, 2007).

Mediante análisis bioinformáticos se ha propuesto una sinergia entre la fosforilación y la sumoilación. La fosforilación de una Ser o Thr introduciría una carga negativa al centro hidrofóbico del motivo consenso, lo que favorecería la interacción con la Lys del sustrato, de carga positiva. De hecho, en algunos casos la carga negativa es conferida por residuos de ácido aspártico y ácido glutámico en el dominio de sumoilación, de manera que se ha sugerido la secuencia  $\psi$ KxExxS/T, como secuencia para la relación fosfo-sumoil (revisado en Kerscher, 2007; Yang y Grégoire, 2006). Los ejemplos en los que se ha observado la necesidad de una fosforilación previa a la conjugación de SUMO son: HSF1 (factor de choque calórico 1, por sus siglas en inglés), que se sumoila en la Lys298 cuando es fosforilado en Ser303 y MEF2 (factor potenciador miocítico 2, por sus siglas en inglés) que es fosforilado por Cdk5, lo que favorece su sumoilación (revisado en Yang y Grégoire, 2006).

Las implicaciones biológicas de la sumoilación aún están en debate; a pesar de ello, se le ha involucrado en procesos tan importantes como la localización celular, la formación de estructuras subnucleares, la modulación de la actividad transcripcional e interacción proteína-proteína y se ha propuesto a la sumoilación como antagónica a la ubiquitinación, al evitar la degradación de la molécula blanco y por lo tanto ocasiona la estabilización de la proteína a la que se conjugó, entre otras (revisado en Kim *et al.*, 2002).

Respecto al papel antagónico que juega la sumoilación sobre la poli-ubiquitinación, el caso más conocido es el del inhibidor de NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  en respuesta a TNF $\alpha$  es fosforilado en la Lys21, la fosforilación es la señal para ser reconocido por la maquinaria de ubiquitinación y consecuentemente es degradado. La sumoilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el mismo residuo, lleva a su estabilización y la disminución de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, siendo otro ejemplo de regulación negativa de la transcripción. Un proceso similar de antagonismo con la ubiquitina es observado en la E3 ligasa de p53, Mdm2 (Desterro *et al.*, 1998; revisado en Kim *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001).

La relación de SUMO con ubiquitina no sólo es antagónica, como se muestra en la **Tabla 4**, sino que tienen varias similitudes como la formación de cadenas. La señal que permite el ensamblaje del proteosoma es la cadena de poli-ubiquitinación de la proteína blanco con la consiguiente degradación de la molécula modificada; dos de las cuatro moléculas de SUMO (SUMO-2 y -3) pueden formar cadenas *in vivo*, a través de

las Lys15 y Lys11, respectivamente (Tatham *et al.*, 2001). SUMO 1, no presenta el sitio consenso en su estructura que pudiera indicar la formación de cadenas *in vivo*, aunque *in vitro* puede darse en las Lys18 y Lys17 (revisado en Mukhopadhyay y Dasso, 2007).

El primer sustrato identificado para SUMO fue la proteína citoplásmica RanGAP1 y se observó que su sumoilación llevaba a la interacción con RanBP2, una proteína del complejo del poro nuclear; así se adjudicó su participación en la localización nuclear de proteínas y la estabilización de interacciones, posiblemente mediando algún cambio estructural en el extremo C-terminal de RanGAP1 que permite la unión a RanBP2 (Mahajan *et al.*, 1997; revisado en Kim *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001).

La proteína de leucemia promielocítica (PML, por sus siglas en inglés) es otro blanco importante de SUMO, el cual ha validado su implicación en la formación de estructuras subnucleares, pues PML sumoilada forma cuerpos nucleares (denominados PML NBs) y su sumoilación es prerequisite para la formación de los PML NBs. Los PML NBs, además se han caracterizado como sitios de reclutamiento al asociarse transitoriamente moléculas como CBP, Sp100, Daxx, Rb, p53 y BLM, también sumoilados (Kamitani *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2006; revisado en Müller *et al.*, 2001; Kerscher *et al.*, 2006).

El reclutamiento de p53 en los PML NBs se relaciona con un incremento en la actividad transcripcional de p53 y a su vez esto ocasiona un incremento en su actividad apoptótica (Fogal *et al.*, 2000). Sin embargo, el reclutamiento de otros factores de transcripción en los PML NBs resulta en la inhibición de su actividad transcripcional, algunos de los cuales tienen en común el estar sumoilados. El papel de SUMO en la transcripción ha sido mayoritariamente asociado a la represión que a la inducción, por ejemplo, Sam68 es una proteína represora que inhibe la transcripción de la ciclina D1 al unirse al RNA y su sumoilación potencia la represión (Babic *et al.*, 2006). También la actividad transcripcional de c-jun y RA es regulada negativamente por SUMO (revisado en Kim *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2001).

Los elementos para la sumoilación son esenciales en *S. cerevisiae*, ya que las mutaciones de *SMT3* (homólogo a SUMO), *UBA2*, *AOS1*, *UBCA9Y* *ULP1*, los genes que codifican para las proteínas requeridas en la conjugación, ocasionan defectos en la progresión del ciclo celular y la mutante en *ULP2* además, sufre hipersensibilidad a daño a ADN y segregación incorrecta de cromosomas (revisado en Kim *et al.*, 2002). Además, se ha implicado a la sumoilación con patologías como la enfermedad de Huntington, en la cual la ubiquitinación de la huntingtina correlaciona con una disminución de la neurodegeneración; sin embargo, la sumoilación de la misma proteína en *Drosophila* exagera los síntomas de la enfermedad, pudiendo deberse a la estabilización de la proteína cuando ésta es sumoilada (revisado en Kerscher *et al.*, 2006).

#### IV. ANTECEDENTES

##### A. Muerte celular programada no apoptótica mediada por SP/NK<sub>1</sub>R.

En las neuronas, se ha identificado una vía capaz de inducir la muerte autofágica, en la cual participan el receptor de neurokinina-1 (NK<sub>1</sub>R) y el neurotransmisor sustancia P (SP). La interacción SP/NK<sub>1</sub>R activa una forma de muerte celular programada (MCP) independiente de caspasas, tanto en neuronas como en células no neuronales (HEK293T), cuya morfología es diferente a la apoptosis pues no hay presencia de burbujeo de la membrana citoplásmica, ni fragmentación nuclear (TUNEL negativas), ni translocación de fosfatidilserina (Anexina-V negativas); además, no se evita por inhibidores de caspasas (z-VAD.fmk y BAP) (Castro-Obregón *et al.*, 2002), todas características propias de la apoptosis. A diferencia de la apoptosis, además, la muerte mediada por SP/NK<sub>1</sub>R presenta vacuolación del citoplasma (Castro-Obregón *et al.*, 2002).

NK<sub>1</sub>R es un receptor acoplado a proteínas G, de manera que al unirse a su ligando, la SP, puede activar sistemas de segundos mensajeros como la movilización de Ca<sup>2+</sup> tanto intra como extracelular, al estimularse la fosfolipasa C, la movilización de ácido araquidónico a través de la fosfolipasa A2; además puede incrementar los niveles de AMPc por la activación de la adenilato ciclasa (revisado en Quartara y Maggi, 1997). Sin embargo, la vía de muerte en la que están involucrados SP/NK<sub>1</sub>R es independiente de los segundos mensajeros mencionados (Castro-Obregón *et al.*, 2004).

Los elementos bioquímicos que son requeridos en la activación de la cascada de señalización que enciende la SP al unirse a NK<sub>1</sub>R incluyen a la molécula acopladora arrestina 2, cuya región C-terminal interactúa con NK<sub>1</sub>R, permitiendo la formación de un complejo proteico con la MAPK cinasa cinasa Raf-1, que fosforila a la MAPK cinasa MEK2; ésta a su vez, activa a la MAPK ERK2 y quién a su vez fosforila a Nur77 (**Figura 8**). La manera como se identificó la participación de Nur77 en este modelo de muerte fue mediante ensayos de microarreglos, al comparar el transcriptoma de células en proceso de muerte por autofagia con el transcriptoma de células vivas (Castro-Obregón *et al.*, 2004). Se identificaron 91 genes inducidos durante la muerte autofágica, de los cuales Nur77 fue un candidato importante por el antecedente de su fosforilación por ERK2 y no ERK1 (Slagsvold *et al.*, 2002) y por su participación en la muerte celular descrita en la sección anterior.

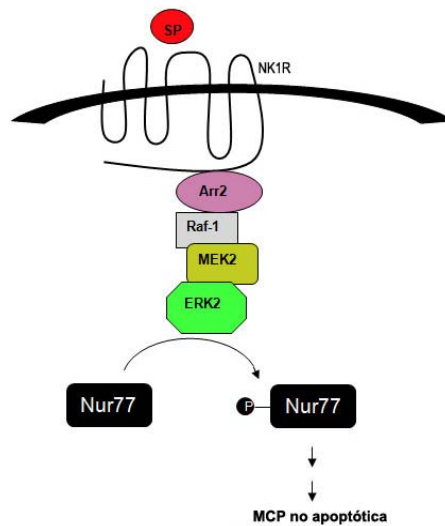


Figura 8. Modelo de la muerte inducida a través de la señalización SP/NK1R (Castro-Obregón *et al.*, 2004).

### B. Posible sumoilación de la familia de Nur77.

Como se mencionó anteriormente, Nur77 promueve tanto la muerte celular como la sobrevivencia. Posiblemente modificaciones postraduccionales como la fosforilación y/o la sumoilación determinen la ubicación intracelular de Nur77, y de esta manera se influya en su función específica.

Si bien no hay antecedentes que muestren la sumoilación de Nur77, Nurr1, miembro de la misma familia que Nur77, interactúa con PIAS $\gamma$ , proteína E3 ligasa para SUMO; el resultado de dicha interacción lleva a la inhibición de la actividad transcripcional dependiente de Nurr1 (Galleguillos *et al.*, 2004) (Figura 9). Aunque aún se desconoce si Nurr1 se sumoila, presenta motivos consenso de sumoilación que están conservados en la familia NR4A; sin embargo, no hay sugerencias de las lisinas candidatas como posible blanco de sumoilación para Nur77 y Nor-1.

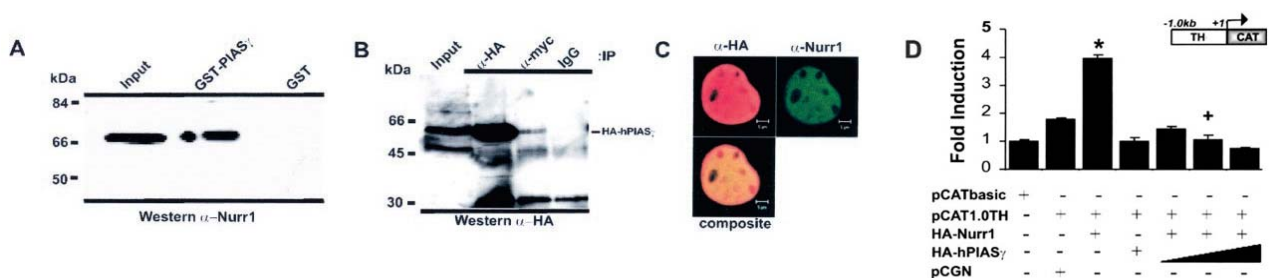
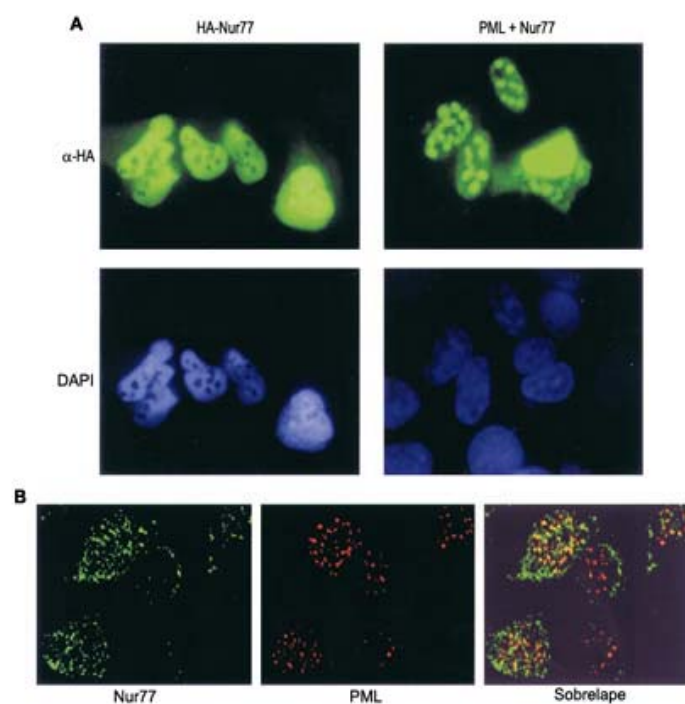


Figura 9. Interacción de Nurr1 con PIAS $\gamma$ . A, Ensayo de precipitación con GST en células COS-1; B, inmunoprecipitación de extractos totales de células HEK293T, anti-HA para PIAS $\gamma$  y anti-myc para Nurr1; C, colocalización de PIAS $\gamma$  y Nurr1 en células COS-1, anti-HA para PIAS $\gamma$ . D, Inhibición de la transcripción de tirosin hidroxilasa (TH), la enzima limitante en la producción de dopamina y cuya transcripción es dependiente de Nurr1, al interactuar Nurr1 con PIAS $\gamma$ ; la represión es dosis dependiente de PIAS $\gamma$ . Tomada y modificada de Galleguillos *et al.*, 2004.

Lo anterior nos lleva a pensar que así como Nur77 podría ser sumoilado, Nur77 también podría ser modificado postraduccionalmente por moléculas de SUMO, como respuesta a cambios en su medio. Las posibles consecuencias de esta modificación sobre Nur77 podrían ser una relocalización intracelular, la interacción con un grupo distinto de proteínas, su estabilización o regulación de su actividad transcripcional.

Respecto a la localización intracelular de Nur77 en el modelo de muerte autofágica inducida por SP/NK<sub>1</sub>R, ensayos previos en nuestro laboratorio sugieren que su ubicación es nuclear. Utilizando un gen reportero con luciferasa, bajo el control de un promotor mínimo que contiene los elementos responsivos a Nur77, se observó que la proteína está transcripcionalmente activa (Rodríguez-Valentín, trabajo en preparación). Además, resultados preliminares de inmunofluorescencia reportan la visualización, de forma punteada y nuclear de Nur77 (Gracida, datos no publicados), haciendo factible la asociación de Nur77 a cuerpos nucleares como los PML.

Apoyando la hipótesis anterior, existen dos trabajos en donde describen la localización de Nur77 en estructuras nucleares, uno de ellos es independiente de PML. En la estimulación de células HeLa con agentes genotóxicos (camptotecina, cisplatino y radiación UV) se observa la asociación de Nur77 a estructuras nucleares, las cuales no son PML NBs (Léséleuc y Denis, 2006); sin embargo, en la línea U2OS al estimular con TPA o interferon se observa la asociación de Nur77 con PML en cuerpos nucleares (Wu *et al.*, 2002) (**Figura 10**). Este último ejemplo abre la posibilidad de que Nur77 en la muerte no apoptótica sea sumoilado y relocalizado, ya sea a en cuerpos nucleares PML o de otro tipo.



**Figura 10. Colocalización de Nur77 y PML.** A Transfección de Nur77 (izquierda) y PML + Nur77 (derecha), visualización de estructuras nucleares punteadas al cotransfectar ambas proteínas; B. Detección de proteínas endógenas, colocalización de proteínas endógenas (Wu *et al.*, 2002).

## V. HIPÓTESIS

El receptor nuclear Nur77 es sumoilado durante la muerte celular inducida por SP/NK<sub>1</sub>R, modulando su localización intracelular.

## VI. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si el receptor nuclear Nur77 es sumoilado y analizar su localización intracelular durante la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R.

### A. Objetivos particulares

1. Analizar si durante la muerte celular se modifican los patrones de sumoilación de las proteínas totales.
2. Comparar las secuencias de los tres miembros de la familia NR4A para identificar los motivos consenso de sumoilación.
3. Determinar si Nur77 puede ser sumoilado *in vitro*.
4. Observar si Nur77 es sumoilado durante la muerte celular inducida por SP/NK<sub>1</sub>R.
5. Estudiar la distribución intracelular de Nur77, buscando la formación de cuerpos nucleares durante la muerte celular inducida por SP/NK<sub>1</sub>R.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

### A. Microbiología

#### 1. *Bacterias quimiocompetentes*

##### Soluciones

###### *Medio LB (1 L)*

Triptona 1% (10 g)

Extracto de levadura 0.5% (5 g)

NaCl 85.55 mM (5 g)

NaOH 1 N 1 ml

Esterilizar en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

###### *Buffer TB*

Pipes 10 mM

CaCl<sub>2</sub> 15 mM

KCl 250 mM

MnCl<sub>2</sub> 55 mM

Mezclar todo, excepto el MnCl<sub>2</sub>.

Ajustar el pH a 6.7 con HCl.

Agregar el MnCl<sub>2</sub>.

Filtrar en mechero con membrana de 0.45 μ y almacenar a 4° C.

###### *DMSO estéril* (Sigma #D2650)

###### *Medio SOC (100 ml)*

Triptona 2% (2 g)

Extracto de levadura 0.5% (0.5 g)

NaCl 10 mM (0.0584 g)

KCl 2.5 mM (0.0186 g)

Ajustar el pH a 7 con KOH.

Esterilizar en autoclave.

###### *Medio LB sólido (1 L)*

NaCl (10 g)

Triptona 1% (10 g)

Extracto de levadura 0.5 % (5 g)

Agar 2% (20 g)

Agregar 959 ml de agua bidestilada.

Ajustar pH a 7 con NaOH 5 N.

Aforar a 1 litro y hacer alícuotas de 300 ml.

Esterilizar por autoclave a 121 psi por 15 minutos.



*Medio selectivo*  
Medio LB sólido  
Antibiótico de resistencia

Fundir completamente el medio LB con la ayuda del horno de microondas, aproximadamente durante 15 minutos a 20% de potencia, moviendo ocasionalmente para favorecer la dispersión del calor.

Dejar que se enfríe el medio, hasta que pueda tocarse con la mejilla y no quemar.

Frente al mechero, agregar el antibiótico de resistencia necesario, de acuerdo al plásmido que se va transformar, a la concentración de trabajo correspondiente y mezclar. En el caso de ampicilina, la concentración de trabajo es 100  $\mu\text{g/ml}$ , disuelta en agua.

En condiciones de esterilidad, verter el medio con antibiótico dentro de una caja Petri, cubriendo aproximadamente de 1/3 a 1/2 de la caja (aproximadamente 30 ml).

Eliminar las burbujas pasando la flama del mechero cerca de la superficie.

Dejar solidificar el medio a temperatura ambiente. Una vez solidificado el medio, guardar las cajas dentro de una bolsa y almacenar a 4°C hasta un mes.

**a) Producción de bacterias quimiocompetentes.** Tomado y modificado de Inoue *et al.*, 1990. Con este protocolo se alcanzó una eficiencia de  $1 \times 10^6$  ufc/ $\mu\text{g}$  ADN súper-enrollado.

Todo debe hacerse frente a mechero, en condiciones de esterilidad.

De un cultivo, picar una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  e inocular 3 ml de medio LB sin antibiótico; incubar a 37°C, en agitación, toda la noche (14 a 16 horas).

Tomar 2.5 ml de preinóculo e inocular 250 ml de medio LB sin antibiótico en un matraz de 2 litros; incubar a 37°C, en agitación, hasta alcanzar una O.D. de 0.6-0.7 a 595 nm; toma aproximadamente de 3 a 4 horas.

Incubar en hielo por 10 minutos, para detener el crecimiento bacteriano.

Transferir el inóculo a un frasco de centrifuga de 250 ml y centrifugar a 2,500 g, 10 minutos a 4° C (rotor JA14).

Resuspender la pastilla cuidadosamente con pipeta, en 75 ml de buffer TB frío e incubar 10 minutos en hielo.

Centrifugar a 2,500 g, 10 minutos a 4° C.

Resuspender la pastilla cuidadosamente en 20 ml de buffer TB frío.

Agregar 1.4 ml de DMSO (7% final). El DMSO es un compuesto que resulta tóxico para las células a temperatura ambiente, por lo que al agregarlo deben colocarse las bacterias inmediatamente en hielo.

Incubar en hielo 10 minutos.

Hacer alícuotas de 600 µl cada una.

Congelar en nitrógeno líquido y almacenar a -70° C.

#### **b) Determinación de la eficiencia de bacterias quimiocompetentes (transformación).**

Descongelar una alícuota de células quimiocompetentes, en hielo.

Frente a mechero, en condiciones de esterilidad, pasar 200 µl de células a un tubo BD Falcon de 14 ml de polipropileno (Falcon, #352059); los tubos de vidrio bajan la eficiencia.

Agregar 1 ng de plásmido súper-enrollado, mezclarlo cuidadosamente un par de veces con pipeta.

Incubar 30 minutos en hielo, posteriormente se da un pulso de 45 segundos a 42° C; un mayor tiempo baja la eficiencia.

Pasar a hielo y agregar 800 µl de medio SOC.

Transferir a tubo de ensayo y dejar recuperar 1 hora a 37° C, en agitación.

Platear en medio selectivo las diluciones: 1/10 y 9/10. Para una eficiencia de  $1 \times 10^6$  ufc/µg ADN súper-enrollado se esperan obtener 100 colonias en la dilución 1/10; para una eficiencia de  $1 \times 10^7$  ufc/µg ADN súper-enrollado se esperaría obtener 1000 colonias en la dilución 1/10.

## 2. Bacterias electrocompetentes.

### Soluciones

#### *Medio LB (1 L)*

Triptona 1% (10 g)

Extracto de levadura 0.5% (5 g)

NaCl 85.55 mM (5 g)

NaOH 1 N 1 ml

Esterilizar en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

#### *Medio GYT (50 ml)*

Glicerol 10% (5 ml)

Extracto de levadura 0.125% (62.5 mg)

Triptona 0.25% (125 mg)

Esterilizar en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

#### *Glicerol 10% (1 L)*

100 ml de glicerol

Aforar a 1 L con agua bidestilada.

Esterilizar en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

#### *2M Mg (10 ml)*

MgCl<sub>2</sub> 1 M (2.055 g)

MgSO<sub>4</sub> 1 M (2.46 g)

Aforar a 10 ml.

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.

#### *Glucosa 2 M (10 ml)*

3.6 g de glucosa

Aforar a 10 ml con agua bidestilada.

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.

#### *Medio SOC (100 ml)*

Triptona 2% (2 g)

Extracto de levadura 0.5% (0.5 g)

NaCl 10 mM (0.0584 g)

KCl 2.5 mM (0.0186 g)

Ajustar el pH a 7 con KOH.

Esterilizar en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

#### *Medio de recuperación (1 ml)*

980 µl de medio SOC

10 µl de Mg 2M

10 µl de glucosa 2M

a) **Producción de bacterias electrocompetentes.** Este tipo de bacterias competentes son indicadas para transformar plásmidos con menos sales que en el caso de las bacterias quimiocompetentes, pues una elevada cantidad de sales genera descarga al electroporar, lo que mata a las bacterias y reduce

considerablemente la eficiencia de transformación. Con este protocolo se alcanzó una eficiencia de  $3.3 \times 10^6$  ufc/ $\mu$ g ADN súper-enrollado.

Todo se hace frente a mechero, en condiciones de esterilidad.

De un cultivo, picar una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  e inocular 3 ml de medio LB sin antibiótico; incubar a 37°C, en agitación, toda la noche (14 a 16 horas).

Tomar 2.5 ml de preinóculo e inocular 250 ml de medio LB sin antibiótico en un matraz de 2 litros; incubar a 37°C, en agitación, hasta alcanzar una O.D. de 0.6-0.7 a 595 nm; toma aproximadamente de 3 a 4 horas.

Incubar en hielo 30 minutos, para detener el crecimiento bacteriano.

Verter el inóculo a un frasco de centrifuga de 250 ml y centrifugar 10 minutos a 4°C, a 4,800 g (rotor JA14).

Resuspender cuidadosamente en 125 ml de glicerol frío al 10%.

Centrifugar nuevamente 10 minutos a 4°C, a 4,800 g.

Resuspender cuidadosamente en 125 ml de glicerol frío al 10%.

Centrifugar 10 minutos a 4°C, a 4,800 g.

Resuspender la pastilla en una mezcla de 500  $\mu$ l de medio GYT y 500  $\mu$ l de glicerol 10%, fríos.

Hacer alícuotas de 50  $\mu$ l y congelar con nitrógeno líquido, almacenar a -70°C.

Transformar una alícuota por electroporación, para comprobar la eficiencia.

## **b) Determinación de la eficiencia de bacterias electrocompetentes (electroporación)**

Colocar en hielo las cubetas o celdas de electroporación previamente lavadas con etanol al 70%, en caso de ser rehusadas.

Descongelar en hielo una alícuota por celda.

Preparar el medio de recuperación.

Agregar 1 ng de plásmido súper-enrollado a las bacterias y pasar la mezcla a la celda de electroporación.

Dar un pulso en electroporador (25 mF, 200 ohms, 275 kv).

Agregar inmediatamente el medio de recuperación y transferir a un tubo de ensayo.

Incubar 1 hora a 37°C, en agitación a 200 rpm y platear diluciones (1/10 y 9/10) en medio selectivo. Para una eficiencia de  $1 \times 10^6$  se esperan encontrar 100 colonias en la dilución 1/10; para una eficiencia de  $1 \times 10^7$  se esperan 1000 colonias en una dilución 1/10.

## B. Biología molecular

### 1. Purificación de plásmidos

a) *Purificación de plásmidos calidad transfección mediante el kit QIAGEN plasmid purification (QIAGEN, # 12162).*

#### Soluciones

##### *Buffer P1 o de resuspensión*

Tris-Cl 50 mM, pH8

EDTA 10 mM

RNAsa A 100 mg/ml

Una vez agregada la RNAsa, almacenar a 2-8°C

##### *Buffer P2 o de lisis*

NaOH 200 mM

SDS 1%

##### *Buffer P3 o de neutralización*

Acetato de potasio 3 M, pH 5.5

##### *Buffer QBT o equilibrador*

NaCl 750 mM

MOPS 50 mM, pH 7

Isopropanol 15%

Triton X-100 0.15%

##### *Buffer QC o de lavado*

NaCl 1 M

MOPS 50 mM, pH 7

Isopropanol 15%

##### *Buffer QF o de elución*

NaCl 1.25 M

MOPS 50 mM, pH 7

Isopropanol 15%

##### *Isopropanol*

##### *Etanol 70% (50 ml)*

15 ml de etanol

35 ml de agua bidestilada

**Purificación de plásmidos calidad transfección.** Se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

Picar una colonia previamente transformada con el plásmido de interés, inocular 3 ml de medio LB con el antibiótico de resistencia adecuado e incubar a 37° C, en agitación, durante 8 horas.

Con 500 µl de preinóculo, inocular 250 ml de medio LB con el antibiótico de resistencia adecuado e incubar a 37° C, en agitación, toda la noche (14-16 horas).

Transferir el inóculo a un frasco de centrifuga de 250 ml y centrifugar 15 minutos a 6,000 g a 4° C (rotor JA14).

Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla vigorosamente con 10 ml de buffer P1. Si se desea, una vez retirado el sobrenadante, se puede congelar la pastilla a -20°C hasta una semana.

Agregar 10 ml de buffer P2 e incubar 5 minutos a temperatura ambiente, mezclando cuidadosamente por inversión. El buffer P1 contiene un reactivo (LyseBlue) que torna azul la mezcla al ser agregado el buffer P2, el tono debe ser homogéneo. El reactivo LyseBlue indica la lisis total y homogénea de las bacterias cuando se consigue la tonalidad azul homogénea.

Agregar 10 ml de buffer P3 frío, mezclando cuidadosamente por inversión, e incubar 30 minutos en hielo. Al agregar el buffer P3, la mezcla recupera la tonalidad blanquecina homogénea, esto indica la neutralización completa del buffer P2, evitando microambientes que podrían dañar el plásmido.

Centrifugar 30 minutos a 20,000 g a 4° C.

Recuperar sobrenadante y centrifugar 15 minutos a 20,000 g, a 4°C.

Equilibrar las columnas (QIAGEN-tip) con 10 ml de buffer QBT, sobre un matraz Kitasato, para evitar el vacío.

Pasar el sobrenadante por la columna y lavar con 30 ml de solución QC dos veces.

Cambiar la columna a un tubo de centrifuga de 50 ml y eluir el ADN con 10 ml de solución QF. Adicionar 10.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente y mezclar.

Centrifugar 30 minutos a 15,000 g a 4° C (rotor JA20).

Decantar el sobrenadante, enjuagar la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Centrifugar 10 minutos a 15,000 g a 4° C (rotor F2402) y decantar el sobrenadante cuidando de no despegar la pastilla.

Dejar secar a temperatura ambiente aproximadamente 5 minutos.

Resuspender en 70-200  $\mu$ l de agua, grado Biología Molecular, según tamaño de la pastilla.

Para probar que se trate del plásmido de interés, se hacen digestiones con enzimas de restricción adecuadas según el plásmido y se corre un gel de agarosa 1%. Ver preparación del gel adelante.

Cuantificar el plásmido por gel y espectrofotometría (260 nm), como se indica posteriormente. Llevarlo a la concentración de trabajo (1  $\mu$ g/ $\mu$ l).



## b) Purificación de plásmidos a pequeña escala (miniprep casero).

### Soluciones

#### *Solución 1*

Glucosa 5 mM

EDTA 10 mM

Tris-HCl 25 mM, pH 8

#### *Solución 2*

NaOH 10 N

SDS 10 %

Agua bidestilada

#### *Solución 3 (100 ml)*

Acido acético (11.5 ml)

Agua bidestilada (28.5 ml)

Mezclar antes de agregar potasio acetato de potasio 5M.

Ajustar a pH 4.8

### ***Método:***

Picar una colonia transformada con el plásmido de interés e inocular 3 ml de medio LB con el antibiótico de resistencia requerido.

Incubar a 37° C toda la noche (14-16 horas).

Centrifugar 1 minuto a 17,530 g a 4°C (rotor F2402).

Tirar sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 µl de solución 1.

Agregar 200 µl de solución 2, mezclando cuidadosamente por inversión.

Añadir 150 µl de solución 3, mezclando cuidadosamente por inversión.

Centrifugar 5 minutos a 17,530 g a 4°C (rotor F2402).

Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Agregar igual volumen de isopropanol y mezclar.

Centrifugar 15 minutos a 17,530 g (rotor F2402).

Tirar el sobrenadante y resuspender en 500  $\mu$ l de agua grado Biología Molecular.

Agregar 10  $\mu$ l de RNAsa 10 mg/ml e incubar 20 minutos a 37° C.

Agregar 500  $\mu$ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1) y dar un pequeño vórtex.

Centrifugar 2 minutos a 17,530 g (rotor F2402).

Recuperar la fase acuosa (superior) en un tubo eppendorf nuevo y agregar nuevamente 500  $\mu$ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1), dando un pequeño vórtex.

Centrifugar 2 minutos a 17,530 g (rotor F2402).

Recuperar la fase acuosa (superior) en un tubo eppendorf nuevo y agregar 500  $\mu$ l de cloroformo/isoamílico (24:1) y dar un pequeño vórtex.

Centrifugar 2 minutos a 17,530 g (rotor F2402).

Recuperar la fase acuosa (superior) en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml, precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto y frío.

Incubar en hielo 15 minutos.

Centrifugar 10 minutos a 17,530 g a 4°C (rotor F2402).

Lavar pellet en 1 ml de etanol 70% frío.

Centrifugar 10 minutos a 17,530 g a 4°C (rotor F2402).

Dejar secar a temperatura ambiente.

Resuspender en 30-50  $\mu$ l de agua grado Biología Molecular, de acuerdo al tamaño del pellet.

### c) Comprobación del plásmido de interés

Con base al mapa de la construcción, seleccionar una enzima de restricción con sitio único y hacer una digestión mezclando lo siguiente:

1  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:10 del plásmido súper-enrollado.

Buffer correspondiente a la enzima a 1x final.

En caso de que la enzima requiera BSA, se usa 1x final.

5 unidades/ $\mu\text{g}$  de ADN, de la enzima de restricción.

Aforar a 10  $\mu\text{l}$  con agua grado Biología Molecular.

Incubar 1 hora a la temperatura adecuada para la actividad de la enzima.

Cargar la digestión en un gel de agarosa de acuerdo a las siguientes proporciones:

Tabla 5. Cargado de gel de agarosa		
<i>Carril 1</i>	<i>Carril 2</i>	<i>Carril 3</i>
<i>Marcador de peso molecular</i>	<i>Plásmido súper-enrollado</i>	<i>Plásmido digerido</i>
1 $\mu\text{l}$ de buffer de carga 6x (1 x final)	1 $\mu\text{l}$ de buffer de carga 6x (1 x final)	1 $\mu\text{l}$ de buffer de carga 6x (1 x final)
3 $\mu\text{l}$ de marcador de peso molecular (Mass ruler, Fermentas, # SM0403)	1 $\mu\text{l}$ de plásmido súper-enrollado	3 $\mu\text{l}$ de plásmido digerido
2 $\mu\text{l}$ de agua grado Biología Molecular	4 $\mu\text{l}$ de agua grado Biología Molecular	2 $\mu\text{l}$ de agua grado Biología Molecular
6 $\mu\text{l}$ volumen final	6 $\mu\text{l}$ volumen final	6 $\mu\text{l}$ volumen final

### d) Preparación de gel de agarosa

#### Soluciones

*TAE 10x (500 ml)*

400 mM Tris base (24.2 g)

1.14% ácido acético glacial (5.7 ml)

10 ml EDTA 500 mM

La dilución de trabajo es 1x.

*Bromuro de etidio 250  $\mu\text{g/ml}$  (10 ml)*

2.5 mg de bromuro de etidio.

Aforar a 10 ml con agua grado biología molecular.

Almacenar a temperatura ambiente en aluminio, pues la exposición a la luz lo degrada.

Usar guantes, cubreboca y bata al pesar bromuro de etidio, pues es un agente mutagénico.

La concentración de trabajo es 0.25  $\mu\text{g/ml}$  final.

A partir de un stock de buffer TAE 10x, hacer una dilución 1/10 para obtener 350 ml de buffer TAE para un gel de 17 carriles o 340 ml de buffer TAE 1x para un gel de 8 carriles, a la dilución de trabajo.

Preparar 25 ml (gel de 17 carriles) o 15 ml (gel de 8 carriles) de solución de 1% p/v de agarosa, disuelta en buffer TAE.

El buffer TAE restante (325 ml ó 315 ml, según el caso), sin agarosa, verterlo a la cámara de electroforesis.

Fundir la agarosa en el horno de microondas hasta que desaparezcan los granos de la agarosa, toma aproximadamente 20 segundos al 100% de potencia.

Esperar a que enfrié un poco la agarosa y agregar bromuro de etidio 0.25  $\mu\text{g/ml}$  final (1  $\mu\text{l/ml}$  de bromuro 250  $\mu\text{g/ml}$ ), así como al buffer restante sin agarosa.

Verter la agarosa sobre la charola para geles y colocar el peine, toma aproximadamente 10 minutos en gelificar.

Colocar el gel dentro de la cámara de electroforesis con buffer y cargarlo.

Corre el gel a 50 mV, toma aproximadamente 40 minutos.

Observar el gel exponiéndolo a luz UV, si el plásmido es el correcto y se eligió una enzima de restricción con sitio único correcta, debe observarse una banda del tamaño correspondiente a la construcción completa, basado en el marcador de peso molecular.

Si se linearizó correctamente el plásmido, cuantificarlo por espectrofotometría y gel de agarosa.

#### **e) Cuantificación de ADN por espectrofotometría.**

Tomar 2  $\mu\text{l}$  de plásmido súper-enrollado y agregar 498  $\mu\text{l}$  de agua grado Biología Molecular.

En una cubeta de cuarzo para cuantificar ADN, agregar 500  $\mu\text{l}$  de agua grado Biología Molecular (la misma en la que se diluyo el plásmido) y usarlo como blanco a una lectura de 260 nm.

Desechar el agua y en la misma cubeta, colocar los 500  $\mu\text{l}$  de la dilución de ADN y tomar la lectura de 260 nm y 260 nm/280 nm. La primera sirve para estimar la cantidad de plásmido y la segunda, la pureza del mismo. Los valores de la lectura de 260 nm deben ir de 0.1 a 0.9 para estar dentro del rango lineal, ya que debajo o sobre éstos valores, se tiende a subestimar o sobreestimar las concentraciones reales.

Para obtener los  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de plásmido, se parte de que 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de doble cadena absorbe 1 O.D.

#### ***f) Cuantificación por gel***

Preparar un gel de agarosa como se describió anteriormente.

Cargarlo con las cantidades indicadas de marcador de peso molecular y plásmido súper-enrollado, cargar distintas cantidades de plásmido digerido (3  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$  y 1  $\mu\text{l}$ ).

Observar el gel bajo luz UV y determinar a cual banda del marcador de peso molecular se parece más, en cuanto a intensidad, y calcular los  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de plásmido comparando la intensidad de la banda digerida con una cantidad conocida de ADN, el resultado es multiplicado por la dilución correspondiente.

Debido a que normalmente los valores entre la cuantificación por espectrofotometría y gel no son los mismos, pero si similares, se obtiene la media de los valores de  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , a partir de dichos valores se hace la dilución de trabajo (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

## 2. Western blot

### Soluciones

#### *Buffer de lisis (5 ml)*

Tris-HCl 50 mM, pH 8 (30 mg)

NaCl 100 mM (29 mg)

EDTA 1 mM

NP-40 ó Igepal 0.05% (2.5 ml)

Deoxicolato de sodio 0.25% (12.5 mg)

Antes de usar, adicionar una pastilla inhibidora de proteasas por cada 10 ml de buffer (Mini-complete; Roche # 11 836 153 001).

#### *PBS (Buffer salino de fosfatos) (1 L)*

NaCl 136 mM (8 g)

KCl 2 mM (0.2 g)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (1.44 g)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM (0.24 g)

Disolver en 900 ml de agua, grado cultivo, y aforar a 1 litro.

En campana, esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.

Almacenar a 4°C.

#### *Solución de Bradford (Bio Rad #500 0006)*

Se usa en una proporción 1:4

Preparar al instante.

#### *Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (150 ml)*

Tris base 1.5 M (27.23 g)

80 ml agua bidestilada

Llevar a pH 8.8 con HCl 6N

Aforar a 150 ml.

Almacenar a 4° C.

#### *Persulfato de amonio 10 % (APS) (1 ml)*

100 mg de APS

1 ml de agua bidestilada

A 4° C puede almacenarse hasta 3 semanas.

#### *Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (100 ml)*

Tris base 0.5 M (6 g)

60 ml agua bidestilada

Llevar a pH 6.8 con HCl 6N.

Aforar a 100 ml.

Almacenar a 4° C.

#### *Buffer de corrida 10x pH 8.3 (1 L)*

Tris base 25 mM (30.3 g)

Glicina 192 mM (144 g)

SDS 0.1% (10 g)

Aforar a 1 L con agua bidestilada.

Se usa a 1x.

Almacenar a 4° C.

*Buffer de carga 5x (9.5 ml)*

3.55 ml de agua bidestilada  
1.25 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8  
2.5 ml de glicerol  
2 ml de SDS 10%  
200  $\mu$ l de azul de bromofenol 0.5%  
Alicuotar cada 500  $\mu$ l/tubo  
Almacenar a 4° C  
Se usa a 1x final.

Antes de usar, añadir 25  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada 475  $\mu$ l de buffer.

No poner proteínas en frío después de agregar el buffer de carga ya que se precipita el SDS.

*Buffer de transferencia (1 L)*

Glicina 39 mM (2.9 g)  
Tris base 48 mM (5.8 g)  
SDS 0.037% (0.37 g)  
Metanol 20% (200 ml)  
Se prepara al momento, para evitar evaporación.  
Preenfriar a 4° C.

*Rojo de Ponceau (40 ml)*

Rojo de Ponceau 0.1% (40 mg)  
Ácido acético 5% (2 ml)  
Se almacena en oscuridad.

*TBS 10X (1 L)*

Tris-HCl 200 mM, pH 7.5 (24.22 g)  
NaCl 1.5 M (87.66 g)  
Aforar a 1 L con agua bidestilada.  
Almacenar a 4°C.

*TBST (1 L)*

100 ml TBS 10X  
Tween 20 0.1% (1 ml)  
Aforar a 1 L con agua bidestilada.  
Almacenar a temperatura ambiente hasta 3 meses.

*Leche 5% (50 ml)*

2.5 g de leche Carnation sin grasa.  
Diluir en 50 ml TBST.  
Se prepara al momento, para evitar su contaminación con microorganismos.

*Solución desnudante para remover anticuerpos (10 ml)*

$\beta$ -mercaptoetanol 100 mM (70  $\mu$ l)  
SDS 2% (2 ml SDS 10%)  
Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.7 (1.25 ml)  
Aforar con agua bidestilada.  
Preparar al instante.

**a) Obtención de extractos a partir de células adherentes (línea celular HEK293T).**

**DÍA 1.** Cultivar  $3.5 \times 10^5$  células en platos de cultivo de 35 mm con 2 ml de medio.

**DÍA 2.** Transfectar las células con el plásmido de interés, como se indica en la sección de biología celular.

**DÍA 4.** Hacer la lisis celular 48 horas posteriores a la transfección, para permitir una mayor producción de la proteína a detectar, para lo cual se aspira el medio de cultivo y se agrega 1 ml de PBS frío por plato de 35 mm. Es importante que desde este momento todo se haga en frío para evitar la degradación de proteína.

Despegar las células con raspador; una vez resuspendidas, se transfieren a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Centrifugar 5 minutos a 358 g a 4° C (rotor F2402), para eliminar los restos de medio de cultivo.

Tirar el sobrenadante y resuspender nuevamente en 1 ml de PBS frío. Centrifugar 5 minutos a 358 g a 4° C.

Eliminar el sobrenadante y resuspender en 50  $\mu$ l de buffer de lisis e incubar 20 minutos en hielo.

Transcurridos los 20 minutos, sonicar con 3 pulsos de 20 segundos a amplitud 1 (Minisonix, sonicador, Ultrasonic processor; Modelo S3000) para fragmentar las estructuras celulares no lisadas por el buffer, sobre todo el ADN.

Centrifugar 10 minutos a 17,530 g a 4° C, recuperar el sobrenadante y cuantificar la cantidad de proteína ( $\mu$ g/ $\mu$ l).

**b) Cuantificación de proteína por el método de Bradford.**

El método de Bradford para cuantificar proteína es una técnica colorimétrica que consiste en un colorante llamado Coomassie, el cual se une a residuos hidrofóbicos y de arginina de las proteínas; al unirse reacciona y cambia de una tonalidad verde-rojiza a azul; entre mayor es la cantidad de proteína, más intensa es la coloración y esto es cuantificado a través de espectrofotometría a 595 nm.



Preparar una curva estándar y el análisis de muestras de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 7. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford							
Curva estándar				Análisis de muestras			
Solución de Bradford 1:4 ( $\mu$ l)	Agua ( $\mu$ l)	Buffer de lisis ( $\mu$ l)	BSA [ $1 \mu$ g/ $\mu$ l] ( $\mu$ l)	Muestras	Solución de Bradford 1:4 ( $\mu$ l)	Agua ( $\mu$ l)	Extracto de proteína ( $\mu$ l)
990	9	1	0	1	990	7	3
990	7	1	2	2	990	7	3
990	5	1	4	3	990	7	3
990	3	1	6	n	990	7	3

Medir la absorbancia tanto de la curva estándar como de las muestras. A partir de los datos de la curva estándar, hacer una regresión lineal y obtener valores de la ecuación de la recta ( $y = mx + b$ ; donde: x= proteína y y= absorbancia), para extrapolarlos y determinar la concentración de proteína en los extractos.

Alicuotar los extractos, de manera que haya 20  $\mu$ g por alícuota y almacenar a  $-70^{\circ}$  C hasta su uso, para evitar degradación de la proteína, hasta su uso.

**c) Electroforesis en gel desnaturizante de acrilamida (SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulphate-polycrylamide gel electrophoresis).**

Los geles desnaturizantes contienen, entre otras cosas, SDS el cual es un detergente que permite separar las proteínas de acuerdo a su peso, además de conferirles una carga negativa parcial; esto facilita su migración a través del gel que tiende a ir del cátodo al ánodo. El porcentaje del gel está dado por el tamaño de la proteína, pues si la proteína es de un alto peso molecular necesita un porcentaje bajo de poliacrilamida para poder pasar a través de los poros que forma ésta al polimerizar; por el contrario, si la proteína es de bajo peso molecular el porcentaje del gel deberá ser mayor para retener a las proteínas grandes y permitir una mejor migración de las proteínas pequeñas.

Preparar gel desnaturalizante de acuerdo a la siguiente tabla:

<b>Tabla 8. Proporciones para geles desnaturalizantes</b>				
<i>Soluciones</i>	<i>Gel separador</i>			<i>Gel concentrador 5% (3 ml)</i>
	<i>8% (9 ml)</i>	<i>12 % (9 ml)</i>	<i>15% (9 ml)</i>	
<i>Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8</i>	-	-	-	750 $\mu$ l
<i>Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8</i>	2.385 ml	2.385 ml	2.385 ml	-
<i>Agua</i>	4.185 ml	2.987 ml	2.095 ml	1.697 ml
<i>SDS 10%</i>	90 $\mu$ l	90 $\mu$ l	90 $\mu$ l	30 $\mu$ l
<i>A/B 30%</i>	2.393 ml	3.591 ml	4.488 ml	498 $\mu$ l
<i>APS 10%</i>	72 $\mu$ l	72 $\mu$ l	72 $\mu$ l	22.5 $\mu$ l
<i>TEMED</i>	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l

Mezclar las soluciones para el gel separador de acuerdo a las proporciones indicadas y verterla al cassette para geles de poliacrilamida. Agregar 500  $\mu$ l de alcohol isobutílico sobre el gel, para alinear el gel, y dejar polimerizar. Dejar una muestra de la mezcla de acrilamida en el tubo de 50 ml (Corning # 430828) donde se preparó, para comprobar la polimerización (toma 40 minutos aproximadamente).

Drenar el alcohol isobutílico y preparar ahora el gel concentrador de acuerdo a las proporciones indicadas en la tabla anterior.

Con una jeringa, inyectar el gel concentrador sobre el gel separador y colocar el peine. Esperar aproximadamente 40 minutos a que polimerice, de la misma manera que con el gel separador, dejar una muestra de la mezcla para comprobar la polimerización. Una vez con el gel concentrador, los geles pueden almacenarse en humedad y a 4° C hasta 1 semana; sin gel concentrador pueden guardarse de 2 a 3 semanas.

Preparar las muestras y el marcador de peso molecular de proteínas, mezclándolas con buffer de carga. Es recomendable cargar 30  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína, para una mejor detección.

Ya preparadas las muestras, se incuban 3 minutos a 95° C.

Llenar la cámara de electroforesis con buffer de corrida.

Cargar las muestras y el marcador de proteínas (Page ruler, Fermentas # SM0671 ó Dual color, Bio Rad # 161 0374) en el gel. Los carriles libres de muestra deben ser cargados con buffer de carga y todos los carriles deben tener el mismo volumen.

Correr el gel a 150 V, hasta que el frente de corrida, indicada con por el azul de bromofenol del buffer de carga llegue al final del gel. Toma aproximadamente 2 horas.

#### **d) Transferencia de proteínas de gel de poliacrilamida a membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride)**

Correr SDS-PAGE.

Cortar la membrana de PVDF (Inmobillon-P, Millipore # IPVH00010) del tamaño exacto del gel y prehumedecerla en metanol al 100%, para activarla. Desde este momento debe cuidarse que la membrana siempre se mantenga húmeda.

Prehumedecer esponjas y papeles Wathman (Bio Rad # 1703932) en buffer de transferencia frío, a saturación; de la misma manera, equilibrar el gel y la membrana activada en buffer de transferencia frío.

Amar un sándwich dentro de buffer de transferencia de la siguiente manera: esponja, 2 papeles Wathman, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, 2 papeles Wathman, esponja.

Presionar el sándwich de manera que se eliminen las burbujas formadas y colocar en la cámara de transferencia. El gel debe quedar orientado hacia el cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo.

Llenar la cámara de transferencia con buffer de transferencia y correr durante 90 minutos a 100 V a temperatura ambiente. Puede recurrirse a la transferencia durante toda la noche a 14 V en frío, cuando hay poca proteína.

Para corroborar una transferencia de proteínas correcta, puede teñirse la membrana con rojo de Ponceau al 0.1% durante 5 minutos o bloquearse directamente con leche sin grasa al 5%.

Desde el momento en que termina la transferencia, la membrana tiene una polaridad, ya que las proteínas transferidas son adsorbidas por la membrana, del lado que estuvo en contacto con el gel; por ello, se corta el extremo superior derecho de la membrana y se voltea, de manera el extremo cortado quede en el extremo superior izquierdo durante los pasos siguientes, así quedará expuesta el lado que estuvo en contacto con el gel.

### e) Bloqueo de membrana de PVDF.

El bloqueo de la membrana con leche sin grasa tiene la finalidad de reducir la posible inespecificidad de pegado del anticuerpo que se usará a la membrana y de esta manera se obtienen resultados más limpios o se evitan falsos positivos.

Se incuba la membrana de PVDF transferida con leche sin grasa al 5% 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C, ambos casos en agitación.

Lavar 2 veces por 5 minutos con TBST a temperatura ambiente y en agitación antes de incubar con anticuerpos.

### f) Incubación con anticuerpos

Diluir el anticuerpo primario en TBST de acuerdo a la hoja técnica del mismo e incubar 1 hora si es policlonal o 2 horas cuando es monoclonal; a temperatura ambiente y en agitación.

Lavar 4 veces con volúmenes grandes de TBST por 7 minutos cada vez, en agitación, antes de incubar con el anticuerpo secundario.

Tabla 9. Información de los anticuerpos primarios usados en ensayos de Western blot

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>	<i>Número de catálogo</i>	<i>Región de reconocimiento</i>	<i>Anticuerpo secundario</i>
Anti-Nur77	1:200	Santa Cruz Biotechnology	M-210	Residuos 59-269	Anti-conejo
Anti-p53	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Donado por el Dr. Ramón González	Residuos 32-79	Anti-ratón (IgG <sub>1</sub> )
Anti-SUMO 1	1:1000	Cell signaling	4972	-	Anti-conejo
Anti-SUMO 2/3	1:1000	Cell signaling	4974	-	Anti-conejo
Anti-GAPDH	1:1000	Abcam	Ab9485	-	Anti-conejo
Anti-HA epítotope	1:1000	Sigma	H 6908	Fusionado a N- o C-terminal	Anti-conejo
Anti-myc epítotope	1:1000	Cell signaling	9B11	Fusionado a N- o C-terminal	Anti-ratón

Diluir el anticuerpo secundario en TBST de acuerdo a la hoja técnica e incubar de 30 a 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

<i>Anticuerpo secundario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>	<i>Número de catálogo</i>
Anti-conejo	1:16,000	Sigma	A 0545
Anti-ratón	1:10,000	Amersham	NA 931

Lavar 3 veces con volúmenes grandes de TBST por 5 minutos cada vez, en agitación, para eliminar el anticuerpo no adherido.

### g) Revelado

La fase de revelado es la parte culminante del Western blot, ya que al finalizarla podrá detectarse la proteína de interés. El método de quimioluminiscencia implica el uso de anticuerpos secundarios que tengan acoplada la enzima peroxidasa, ésta en presencia de su sustrato, luminol, va a emitir luz que es detectada por una película sensible a la luz. La intensidad de la luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo primario conjugado al secundario y a su vez es un indicador de la proteína presente.

En oscuridad, verter revelador, fijador y agua, previamente preparados de acuerdo al fabricante, en charolas para revelar.

Incubar la membrana de PVDF 1 minuto con los reactivos de quimioluminiscencia mezclados en proporción 1:1 (ECL Western blotting detection reagents and analysis system; Amersham # RPN2106).

Eliminar el exceso de ECL con papel Wathman, colocar la membrana de PVDF dentro de un acetato y ubicarla con puntos fluorescentes alrededor.

Exponer un film (Kodak, Sigma # Z370398-50EA) durante 1 minuto, inicialmente. El tiempo de exposición disminuye o aumenta de acuerdo a la intensidad de la señal detectada con la primera exposición.

Una vez transcurrido el tiempo de exposición, sumergir el film en revelador, agua, fijador y finalmente por agua; aproximadamente 1 minuto en cada uno.

Indicar el peso molecular en el film de acuerdo al marcador de proteínas.

#### **h) Limpieza de membranas**

La misma membrana puede proporcionarnos distintos datos, para lo cual puede ser limpiada e incubada con distintos anticuerpos primarios varias veces.

Lavar la membrana 10 minutos en TBST a temperatura ambiente y en agitación.

Incubar las membranas a limpiar, 30 minutos con la solución de limpieza de membranas a 50°C, agitando ocasionalmente.

Lavar 2 veces por 10 minutos cada vez, en agitación y a temperatura ambiente con TBST.

Repetir los pasos para bloquear.

Exponer la membrana para verificar que se lavó el anticuerpo anterior.

Lavar 2 veces por 5 minutos cada vez, con TBST, en agitación y a temperatura ambiente.

Repetir los pasos de incubación con anticuerpos.

### 3. Inmunoprecipitación

#### Soluciones

##### *PBS (Buffer salino de fosfatos) (1 L)*

NaCl 136 mM (8 g)

KCl 2 mM (0.2 g)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (1.44 g)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM (0.24 g)

Disolver en 900 ml de agua, grado cultivo, y aforar a 1 litro.

En campana, esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.

Almacenar a 4°C.

##### *Buffer de lisis Tritón x-100*

NaCl 150 mM

Tritón x-100 1%

Tris-HCl 50 mM, pH8

Antes de usar, adicionar una pastilla inhibidora de proteasas por cada 10 ml de buffer (Mini-complete; Roche, # 11 836 153 001).

##### *Buffer de lavado bajo en sales*

Tris-HCl 20 mM, pH 7.5

##### *Buffer de carga 5x (9.5 ml)*

3.55 ml de agua desionizada

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%

Alicuotar cada 500 µl/tubo.

Almacenar a 4° C.

Se usa a 1x final.

Antes de usar, añadir 25 µl de β-mercaptoetanol por cada 475 µl de buffer.

No poner proteínas en frío después de agregar el buffer de carga ya que se precipita el SDS.

**a) Obtención de extractos a partir de células adherentes (línea celular HEK293T).**

**DÍA 1.** Cultivar  $4 \times 10^6$  células en platos de cultivo de 10 cm.

**DÍA 2.** Transfectar las células con el plásmido de interés, de acuerdo a la sección de biología celular.

**DÍA 4.** Hacer la lisis celular 48 horas posteriores a la transfección, para permitir una mayor producción de la proteína a detectar, para lo cual se aspira el medio de cultivo y se agrega 1 ml de PBS 1x frío por plato. Es importante que desde este momento todo se haga en frío para evitar la degradación de proteína.

Resuspender en 1 ml de buffer de lisis.

Incubar 30 minutos en hielo y agitar ocasionalmente.

Centrifugar 10 minutos a 10,000 g a 4° C; recuperar sobrenadante y transferirlo a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.

Tomar 20  $\mu$ l de muestra como TOTAL y guardarla a -70° C. Agregar buffer de corrida a una concentración final de 1x y separar la fracción que se va a cargar en el gel antes de congelar.

**b) Inmunoprecipitación**

Agregar y mezclar el anticuerpo primario a los extractos de acuerdo a la hoja técnica:

<b>Tabla 11. Información de los anticuerpos primarios usados durante ensayos de inmunoprecipitación</b>					
<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>	<i>Número de catálogo</i>	<i>Especie</i>	<i>Proteína con mayor afinidad</i>
Anti-Nur77	1-2 $\mu$ g/ml	Santa Cruz Biotechnology	M-210	Conejo	A
Anti-SUMO 1	1:50	Cell Signaling	4972	Conejo	A
Anti-SUMO 2/3	1:50	Cell Signaling	4974	Conejo	A
Anti epítotope HA	1:200	Sigma	H 6908	Conejo	A
Anti epítotope myc	1:1000	Cell Signaling	9B11	Ratón IgG <sub>2a</sub>	A ó G



Inmediatamente, agregar 50  $\mu\text{l}$  (anticuerpo monoclonal) o 100  $\mu\text{l}$  (anticuerpo policlonal) de proteína A (Miltenyi Biotec, # 130-071-001) ó G (Miltenyi Biotec, # 130-071-101), de acuerdo a la afinidad del anticuerpo primario por éstas.

Mezclar e incubar 1 hora a 4° C en agitación.

Colocar las columnas para inmunoprecipitación ( $\mu\text{MACS}$  protein G microbeads; Miltenyi biotec # 130-071-101) en el imán y equilibrarlas con 200  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis.

Agregar un extracto por columna y enjuagar cada columna 4 veces con 200  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis, cada vez.

Enjuagar las columnas con 100  $\mu\text{l}$  de solución de lavado baja en sales y agregar 20  $\mu\text{l}$  de buffer de carga 2x precalentado a 95° C.

Incubar 5 minutos a temperatura ambiente; colocar un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo debajo de cada columna y agregar 60  $\mu\text{l}$  de buffer de carga 2x precalentado a 95° C y colectar eluido.

Detectar proteínas inmunoprecipitadas por Western blot.

Incubar tanto el TOTAL como las muestras inmunoprecipitadas 3 minutos a 95° C antes de cargar SDS-PAGE.

## C. Biología celular

### 1. *Mantenimiento celular.*

#### Soluciones

##### *D-MEM (Dubelco's Modified Eagle Medium) (1 L).*

Un sobre de medio D-MEM (GIBCO #12100-046)

NaHCO<sub>3</sub> 44 mM (3.7 g)

Disolver el medio en 800 ml de agua grado cultivo, añadir el NaHCO<sub>3</sub> y ajustar el pH a 6.9 con HCl 6N.

En campana, aforar a 1 litro y esterilizar filtrando a través de membrana de 0.22 µm.

Almacenar a 4° C no más de 2 meses.

##### *Suero Fetal Bovino (FBS: Fetal Bovine Serum)*

Calentar el suero fetal bovino (GIBCO #16000-044) a 56° C, por 30 min., para inactivar las proteínas del complemento.

Hacer alícuotas de 40 ml en la campana y almacenar a -20° C.

Al usarlo, descongelar la alícuota y mantenerlo a 4° C hasta 1 mes.

##### *GPS 100X (Glutamina/Penicilina/Estreptomicina) (100 ml)*

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

300 mg de penicilina

500 mg de estreptomina

Agregar la penicilina y estreptomina a 10 ml de Gluta-Max en la campana.

Esterilizar por filtración, a través de membrana de 0.22 µm.

Agregar la mezcla a los 90 ml restantes de Gluta-Max.

Mezclar, hacer alícuotas de 5 ml en la campana y almacenar a -20° C.

Al usarlo, descongelar y mantener a 4° C hasta 1 mes.

##### *PBS (Buffer salino de fosfatos) (1 L)*

NaCl 136 mM (8 g)

KCl 2 mM (0.2 g)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (1.44 g)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM (0.24 g)

Disolver en 900 ml de agua, grado cultivo, y aforar a 1 litro.

En campana, esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.

Almacenar a temperatura ambiente.

##### *Tripsina 0.25% (10 ml)*

1 ml de tripsina 2.5% (GIBCO #15090-046)

9 ml de Verseno (GIBCO #15040-066)

En campana, mezclar y almacenar a 4° C hasta 1 mes.

##### *Medio DMEM suplementado (250 ml)*

220 ml de medio D-MEM

25 ml de FBS (10% final)

2.5 ml de GPS 100X (1X final)

2.5 ml de piruvato de sodio (GIBCO #11360-070)

En campana, mezclar y almacenar a 4° C hasta 1 mes.

*Poli-D-lisina 5 µg/ml (10 ml)*

A partir de un stock 500 µg/ml de Poli-D-lisina (SIGMA P-7886) tomar 100 µl

Aforar a 10 ml con agua grado cultivo

Filtrar en campana y almacenar a 4°C.

**a) Subcultivo de la línea HEK293T.**

A partir de un plato de cultivo de 10 cm:

Aspirar el medio con una bomba de vacío.

Lavar con 3 ml de PBS a temperatura ambiente, dejándolo caer cuidadosamente sobre la pared del plato, no sobre las células.

Aspirar el PBS a través de la bomba de vacío.

Agregar 1 ml de tripsina 0.25%, por cada plato de cultivo de 10 cm, sobre las células para disgregarlas. Agitar ligeramente la caja para favorecer la dispersión de la tripsina e incubar 3 minutos a 37° C.

Añadir 9 ml de medio DMEM suplementado fresco, previamente calentado a 37° C, y dispersar las células pipeteando suavemente.

Transferir el disgregado a tubo de 50 ml (Corning # 430828).

Centrifugar 4 minutos a 220 x g.

Aspirar el medio con la bomba de vacío, cuidando de no aspirar la pastilla.

Resuspender las células en 10 ml de medio DMEM suplementado fresco.

**b) Cuantificación de densidad celular.**

Una vez disgregadas las células, colocar 10 µl del disgregado en cada ranura de la cámara de Neubauer.

Contar 3 cuadrantes de cada ranura (un mínimo de 100 células totales), un cuadrante equivale a 0.1 µl.

Obtener el promedio y extrapolarlo al volumen final en el que se resuspendió, de la siguiente manera:

$$C_T = \frac{(C_P)(V_R)}{0.1\mu l}$$

Donde:

C<sub>T</sub>= Células totales

C<sub>P</sub>= Promedio de células contadas

V<sub>R</sub>= Volumen en que se resuspendió la pastilla

Sembrar de la siguiente manera:

<b>Tabla 12. Proporciones usadas al sembrar células HEK293T</b>				
	<i>Platos de 10 cm (Costar # 430167)</i>		<i>Platos de 35 mm (Corning # 430165)</i>	<i>Cubreobjetos con cámara de cultivo de 0.8 cm<sup>2</sup> (Nunc # 155411)</i>
	<i>Mantenimiento</i>	<i>Inmunoprecipitación</i>		
Número de células	1 x 10 <sup>6</sup>	4 x 10 <sup>6</sup>	3.8 x 10 <sup>5</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>
Medio DMEM suplementado	El necesario para conseguir el volumen final			
Volumen total	10 ml	10 ml	2 ml	300 µl

Antes de sembrar, diluir las células en un tubo de 15 ml (Corning # 430790), agregando primero las células y aforando al volumen deseado con medio DMEM suplementado. NOTA: en el caso de cubreobjetos con cámara de cultivo, deben pretratarse por 2 horas con poli-D-lisina y lavar 2 veces con 100 µl de PBS.

Incubar a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en humedad.

## 2. Almacenaje.

### Soluciones

#### *Medio de congelación 2X (10 ml)*

6 ml de medio D-MEM

2 ml de FBS (20% final)

2 ml de DMSO (Sigma #D2650) (20% final)

#### a) Congelamiento.

Disgregar las células de acuerdo al punto anterior.

Resuspender la pastilla en el volumen requerido para obtener una densidad celular de 6 x 10<sup>6</sup> células/ml.

Agregar gradualmente un volumen igual de medio de congelación 2X al de las células. Mezclar cuidadosamente y hacer alícuotas de 1 ml en crioviales (Corning # 2028), previamente etiquetados con tipo celular, fecha y densidad celular (3 x 10<sup>6</sup> células/vial).

Congelar a -70° C por un día, posteriormente transferir a nitrógeno líquido para un almacenaje más largo.

## b) Descongelamiento.

Incubar el criovial (Corning # 2028) por 1 a 2 minutos a 37° C en baño de agua.

Agregar inmediatamente 1 ml de medio DMEM suplementado fresco y transferir el contenido a un tubo de 15 ml (Corning # 430790); aforar a 5 ml con medio DMEM suplementado, precalentado a 37° C.

Agitar un par de veces por pipeteo y centrifugar 4 minutos a 220 x g.

Aspirar el sobrenadante con la bomba de vacío y resuspender en 10 ml de medio DMEM suplementado.

Sembrar en un plato de cultivo de 10 cm.

Al día siguiente, cambiar el medio por fresco.

### 3. *Transfección transitoria por CaCl<sub>2</sub>*

#### Soluciones

*HBS 2X (100 ml)*

NaCl 273 mM (1.6 g)

KCl 9.9 mM (0.074 g)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.8 mM (0.04 g)

Dextrosa 11 mM (0.2 g)

HEPES 41 mM (1 g)

Disolver en 95 ml de agua grado cultivo.

Preparar tres soluciones y cada una se ajusta a un pH distinto (6.9-7.1).

En campana, filtrar las soluciones a través de membrana de 0.22 µm.

Determinar el buffer con mejor eficiencia (mínimo 70%) transfectando un vector de expresión de GFP, con los diferentes buffer de HBS a distintos pH. El buffer que dé lugar a la mayor eficiencia de transfección (> 70%), alicuotarlo cada 500 µl y almacenarlo a -70° C.

*CaCl<sub>2</sub> 2M (5 ml)*

1.472 g CaCl<sub>2</sub>

Aforar a 5 ml con agua grado cultivo, en campana, filtrarlo a través de membrana de 0.22 µm.

Alicuotar cada 500 µl.

Almacenar a -70° C.

#### Transfección

**DÍA 1.** De acuerdo al experimento, sembrar el número correspondiente de células, 24 horas previas a la transfección.

**DÍA 2.** Reducir el volumen del cultivo a la mitad.

En un tubo eppendorf de 1.5 ml, mezclar para cada muestra:

Tabla 13. Proporciones usadas al transfectar transitoriamente células HEK293T						
	Platos de 10 cm (Costar # 430167)		Platos de 35 mm (Corning # 430165)		Cubreobjetos con cámara de cultivo de 0.8 cm <sup>2</sup> (Nunc # 155411)	
	1 plásmido	Cotransfección	1 plásmido	Cotransfección	1 plásmido	Cotransfección
Agua grado cultivo	244.12 µl	x	38.75 µl	x	3.44 µl	x
ADN (1µg/µl)	31.5 µg	15 µg (por cada plásmido)	5 µg	3 µg (por cada plásmido)	0.44 µg	0.26 µg (por cada plásmido)
Mezclar perfectamente						
CaCl <sub>2</sub> 2M	39.37 µl	39.37 µl	6.25 µl	6.25 µl	0.55 µl	0.55 µl
Incubar 10 minutos a temperatura ambiente y agregar:						
HBS 2x	315 µl	315 µl	50 µl	50 µl	4.44 µl	4.44 µl
Volumen total	613 µl	613 µl	100 µl	100 µl	8.87 µl	8.87 µl

Incubar inmediatamente 2 minutos a 37°C.

Agregar la mezcla al cultivo, por goteo y agitar delicadamente el cultivo para dispersar la mezcla.

Incubar a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en humedad.

**DÍA 3.** Cambiar la solución de transfección por fresco dentro de las 12 a 17 horas posteriores a la transfección.

#### 4. Modelo de muerte celular mediada por SP/NK<sub>1</sub>R.

##### Soluciones

###### *Azul de tripano 10%*

Diluir en PBS y en campana, filtrarlo a través de membrana de 0.22  $\mu$ m.

###### *Sustancia P (SP; Sigma-Aldrich, #S6883)*

Disolver en agua, grado cultivo, a 100  $\mu$ M/ $\mu$ l.

Alicuotar y almacenar a -70°C.

Se usa a 100 nM/ $\mu$ l, final.

La SP es un compuesto muy inestable en solución acuosa, por lo que debe mantenerse en hielo desde su descongelamiento y durante toda su manipulación.

**DÍA 1.** De acuerdo al experimento, sembrar el número correspondiente de células, 24 horas previas a la transfección. El experimento se hace por triplicado.

**DÍA 2.** Transfectar transitoriamente el receptor NK<sub>1</sub> por un lado y por otro pcDNA3.1 (-) como control negativo (**Figura 11**), GFP como control de transfección; de acuerdo al método de transfección transitoria.

**DÍA 3.** 24 horas después de la transfección, agregar SP a una concentración 100 nM final (**Figura 11**). La SP es un compuesto muy inestable en solución acuosa, por lo que debe mantenerse en hielo desde su descongelamiento y durante toda su manipulación.

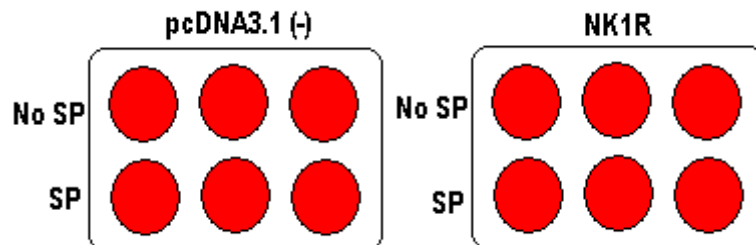


Figura 11. Esquematización del experimento de muerte mediado por SP/NK<sub>1</sub>R

##### a) Cuantificación de muerte

**DÍA 4.** 24 horas posteriores a la adición de SP, agitar un poco el plato de cultivo, tomar el medio con una pipeta y transferirlo a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Centrifugar a 220 x g durante 5 minutos, en microcentrífuga.

Retirar sobrenadante y resuspender en 50  $\mu$ l de azul de tripano 10% en PBS.

Cuantificar células que incorporaron el azul de tripano (muertas) en cámara de Neubauer y extrapolar el número de células muertas totales de la siguiente manera:

$$C_{MT} = \frac{(50\mu l)(C_{MP})}{0.1\mu l}$$

Donde:

$C_{MT}$ = células muertas totales

$C_{MP}$ = Promedio de células muertas contadas en un cuadrante

## 5. Inmunofluorescencia

### Soluciones

#### *Paraformaldehído 4% (10 ml)*

Agregar 20  $\mu$ l de NaOH 5N a 5 ml de agua bidestilada y calentar a 65°C.

Agregar 400 mg de paraformaldehído, agitar hasta disolverlo.

Dejar enfriar y añadir 5 ml de PBS.

Ajustar el pH a 7.2 con HCl.

Aforar a 10 ml con agua bidestilada.

Filtrar con membrana de 0.22  $\mu$ m.

Guardar a 4°C hasta 1 semana.

Usar guantes, cubrebocas y bata al pesar el paraformaldehído, pues es muy tóxico.

#### *PBS/Tritón 0.5% (10 ml)*

50  $\mu$ l de Tritón X-100

9.950 ml de PBS

Almacenar a temperatura ambiente.

#### *PBS/ suero de oveja 4%/ BSA 4% (10 ml)*

400  $\mu$ l de suero de oveja sin inactivar

400 mg de BSA

Aforar a 10 ml con PBS.

Almacenar a 4°C hasta 1 mes.

#### *PBS/ BSA 2% (10 ml)*

200 mg de BSA

Aforar a 10 ml con PBS.

Almacenar a 4°C hasta 1 mes.



Retirar el medio y lavar con PBS.

Fijar las células con 200  $\mu$ l por pozo de PFA 4%, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Retirar el PFA y lavar con PBS.

Permeabilizar con 200  $\mu$ l por pozo de PBS/Tritón 0.5% por 5 minutos a temperatura ambiente.

Lavar con PBS y bloquear durante 30 minutos con PBS/ suero de oveja 4%/ BSA 4%.

Retirar la solución de bloqueo e incubar durante toda la noche (14-16 horas) con el anticuerpo primario a 4°C. El anticuerpo primario es diluido en PBS/BSA 2%.

**Tabla 14. Información de los anticuerpos primarios usados en ensayos de inmunocitoquímica**

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>	<i>Número de catálogo</i>	<i>Anticuerpo secundario</i>
Anti-Nur77	1:100	Santa Cruz Biotechnology	M-210	Anti-conejo
Anti-NK <sub>1</sub> R	1:1000	Sigma	S8305	Anti-conejo

Lavar con 200  $\mu$ l de PBS.

Incubar 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a fluorógeno. El anticuerpo secundario también se diluye en PBS/BSA 2%.

**Tabla 15. Información de los anticuerpos secundarios acoplados a fluorógeno, usados en ensayos de inmunocitoquímica**

<i>Fluorógeno*</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>	<i>Número de catálogo</i>	<i>Señal</i>	<i><math>\lambda</math>(Ex-Em)</i>
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

\* Existen dichos fluorógenos tanto  $\alpha$ -conejo como  $\alpha$ -ratón.

Lavar con 200  $\mu$ l de PBS e incubar a 37°C por 30 minutos con RNAsa 10 mg/ml.

Lavar con 200  $\mu$ l de PBS una e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente con alguno de los siguientes colorantes para núcleo, a excepción de Sytox green que se incuba por 15 minutos:

**Tabla 16. Información de los colorantes para núcleo celular usados en ensayos de inmunocitoquímica**

<i>Colorante</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>	<i>Número de catálogo</i>	<i>Señal*</i>	<i><math>\lambda</math>(Ex-Em)</i>
DAPI	1:1000	Sigma	D9542	Azul	498 nm - 519 nm
Sytox green	20 nM	Invitrogen	S7020	Verde	591 nm - 619 nm
Ioduro de propidio	100 ng/ml	Sigma	81845	Rojo	654 nm - 668 nm

\* Debe tenerse la precaución de usar un colorante de núcleos que emita a una longitud distinta a la del fluorógeno acoplado al anticuerpo secundario.

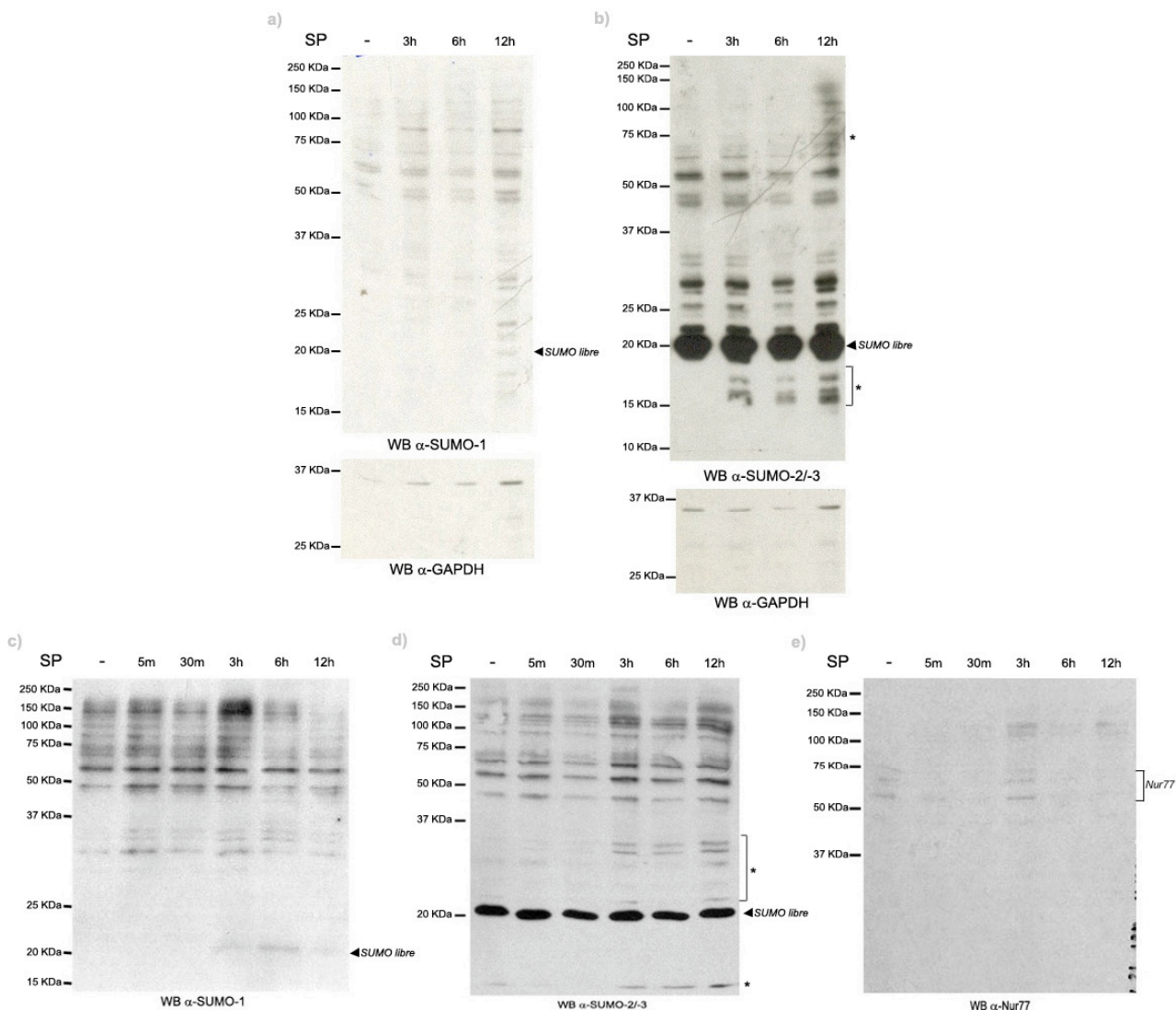
Lavar con 200  $\mu$ l de PBS.

Agregar 300  $\mu$ l de PBS y almacenar las muestras en cámara húmeda a 4°C hasta su observación.

## VIII. RESULTADOS.

### A. Sumoilación general de proteínas durante la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R.

Para determinar si la sumoilación es un proceso dinámico durante la muerte celular no apoptótica, se analizó el patrón de sumoilación general de proteínas mediante una cinética de respuesta a sustancia P en células HEK293T previamente transfectadas con NK<sub>1</sub>R. Se separaron los extractos de proteínas totales en geles desnaturizantes para detectar la presencia de proteínas acomplejadas a SUMO-1 o bien a SUMO-2/-3 (el anticuerpo utilizado reconoce ambas formas), por ensayo tipo Western blot (**Figura 12**).



**Figura 12. Sumoilación general a distintos tiempos de estímulo con SP.** a) y c) Conjugación de SUMO 1; b) y d) Conjugación de SUMO-2/-3; e) Cinética de expresión de Nur77. a-b y c-e son experimentos independientes. Las proteínas totales empleadas fueron obtenidas a partir de células inducidas con SP durante los tiempos indicados, previamente transfectadas con un vector que expresa NK<sub>1</sub>R. El análisis se realizó por ensayo tipo Western blot, en geles desnaturizantes al 12%. El SUMO libre, no conjugado, es indicado con la cabeza de flecha. \* indican las proteínas que aparecen o se acentúan con el estímulo de SP.

Los tiempos considerados para los estímulos con SP fueron elegidos debido a que a las 3 horas se ha observado el pico más alto de expresión de Nur77; resultados previos, indican que a las 6 horas Nur77 es

transcripcionalmente activo (Rodríguez-Valentín, trabajo en preparación) y a las 12 horas comienzan a observarse cambios morfológicos en las células estimuladas. El tiempo 0 o sin SP se tomó como referencia para observar las variaciones en la sumoilación.

En la primera cinética, al detectar SUMO-1 (**Figura 12a**), se observó un incremento en la cantidad de bandas detectadas por el anticuerpo, entre los extractos de células estimuladas con SP con respecto a las no estimuladas. A mayor tiempo de estímulo aumentó la cantidad de proteínas sumoiladas, como puede verse en las bandas menores a los 37 KDa, a las 12 horas de estímulo; sin embargo, al momento de correlacionar la cantidad de proteínas sumoiladas en general con el control de carga (anti-GAPDH), fue evidente que una mayor cantidad de proteína cargada a las 12 horas que en los extractos sin estímulo (no SP). Es decir, en la sumoilación por SUMO-1 pareció no ser evidente la variación (**Figura 12a**).

En el patrón de sumoilación al detectar SUMO-2/-3 a los distintos tiempos de inducción, las variaciones sí fueron evidentes (**Figura 12b**), pues se observaron bandas menores a 20 KDa y mayores a 75 KDa cuando se activó la muerte celular al inducir con SP; dichas bandas no fueron detectadas en extractos de células sin estimular. Si bien es cierto que, como indica el control de carga (anti-GAPDH) hubo mayor cantidad de proteína a las 12 horas, a las 3 y 6 horas de estímulo hubo menor cantidad de proteína y a pesar de ello se observaron las bandas menores a 20 KDa, lo que no fue apreciable al tiempo 0 o sin SP; es decir, la aparición de las bandas parece estar asociada a la inducción de la muerte.

La cinética fue repetida agregando los tiempos de 5 y 30 minutos de estímulo con SP (**Figura 12c-e**), debido al antecedente de que ante estrés calórico y oxidativo, se observan cambios y reversión de dichos cambios en la conjugación de SUMO-2/-3 a tiempos muy cortos (Saitoh y Hinchey, 2000). En este segundo experimento, los patrones de SUMO 1 se observaron distintos (**Figura 12c**). Se incrementó la forma libre de SUMO-1, que no es fácil observar, al hacerse evidente una banda de alrededor de 20 KDa a partir de las 3 horas de inducción con SP.

En cuanto a SUMO-2/-3, se obtuvieron nuevamente las bandas pequeñas, menores a 20 KDa y las bandas mayores a 75 KDa (**Figura 12d**). En la **Figura 12b** se aprecian las bandas mayores a 75 KDa abundantes a las 12 horas de estímulo, mientras que en el segundo experimento hubo un incremento en la intensidad de estas bandas desde las 3 horas (**Figura 12d**); quizá esto se deba a problemas técnicos durante el revelado que podrían solucionarse con una nueva repetición. De la misma manera que en la **Figura 12b**, en la **Figura 12d** las bandas detectadas menores a los 20 KDa aparecieron a partir de las 3 horas de estímulo, confirmando el dato de la primera cinética. Desafortunadamente el control de carga (anti-GAPDH) no fue claro para la segunda cinética, pero se cuantificó por Bradford para cargar la misma cantidad de proteína en cada carril.

Con el antecedente de que los niveles de expresión de Nur77 varían a lo largo de la muerte mediada por SP/NK<sub>1</sub>R (Castro-Obregón *et al.*, 2004), en la **Figura 12e** se detectó a Nur77 a partir de los mismos extractos usados para la segunda cinética de sumoilación. La expresión basal de Nur77 fue muy baja y se

incrementó al estimular las células con SP; a las 3 horas se observó la mayor cantidad de Nur77, ya previamente descrito y aunque este dato no es claro en esta figura, en imágenes posteriores se corrobora (TOTAL de **Figura 15c** y **15g**).

Los patrones diferenciales de sumoilación en respuesta a la muerte inducida por SP son un buen indicador de que esta modificación podría estar jugando un papel importante en la muerte autofágica, por lo que resulta interesante conocer la o las proteínas blanco que son sujetas a la conjugación de SUMO en el proceso.

## B. Comparación de las secuencias de los miembros de la familia NR4A.

La familia NR4A tiene motivos consenso para sumoilación conservados, con las Lys91 y Lys577 como candidatas de sumoilación en Nurr1 (Galleguillos *et al.*, 2004). Sin embargo, no hay sugerencias publicadas para las lisinas candidatas de sumoilación de Nur77 y Nor-1. Mediante un alineamiento de los miembros de la familia a través del programa Clustal W, se confirmó la existencia de dichos sitios para las proteínas humanas de los tres miembros de la familia de Nur77 (**Figura 13**).

Nurr1/1-598	1	MPCVQADYQSSPQAS PASQSYSHSSGEYSSDFLTPEFVKFSMDLTNTEITAT--TSLPSFSTFMDNYSTGYDVKPPCLYQMP-----
Nor-1/1-626	1	MPCVQADYSPSPGSSYAQAQTYSEYTTIEMNPDYTKLTMDLQSTEITATATISLPSISTFVEGYSSNYELKPCSCVYQMQRPL--K
Nur77/1-598	1	MPCIQADYGTAPAPSPGPR-----DHLASDPLTPEFIKPTMDLASPEAAPAAPTALPSFSTFMDGYTGEFDT--FLYQLPGTVQPCS
Nurr1/1-598	83	-LSGQQSSIKVEIQMHNYQQHSHLPPQSEEMMP--HSG-----SVYK-PSSPPTPTTPGFQVQHSFPMWDD--PGSLHNFHQNYV
Nor-1/1-626	86	VEEGRAPSYHHHHHHHHHHHQDQHQQPSIPP--ASSPEDEVLPST-SMYFK-QSPPTPTTAPFPQAGALWDEALPSAPGCIAPGPI
Nur77/1-598	80	SASSASSTSSSATSPASASIKFEIDFQVYGCYPGLSGPVDALSSSGSDYGGSPCSAPSPSTPSFPQPLSPWDG--SFGHSPSQT
Nurr1/1-598	158	AT---THMIEQRKTPVSRSLSLFQKQSPPTVSS---CQMRFD---GPLHVPMPNPEPAQSHHVVDGQTFVAVNPPIRKPAS-MGFPGLQ
Nor-1/1-626	173	LD---PPMKAVPTVAGARFPLFHFKPSPPHPAPSPAGGHHLQYDPTAAAALSLPLGAAAAAGSQAAALESHYPYGLPLAKRAAPLAFPLG
Nur77/1-598	167	YEGLRAWTEQLPKASGPPQPPAFFSFSPTGSPSP-----LAQSPLKLFPSQAT-HQLGEGESYSMPTAFPLAP---TSPH
Nurr1/1-598	237	IG---HASQLLDT--QVPSPPSRGSPSNEGCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRNRRCQYCRFQK
Nor-1/1-626	261	LTPSPTASSLLGESPSPSPSRSSSGEGTCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRNRRCQYCRFQK
Nur77/1-598	240	LE---GSGILDTPVTS TKARSGAPGSEGRCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYICLANKKCPVDKRRNRRCQYCRFQK
Nurr1/1-598	323	CLAVGMVKEVVRTDSLKGRRLRPSKPKS----PQEPSPPSPVSLISALVRAHVDSNPAMTSLDYSRFQANPDYQMSGDDTQHIIQQFYD
Nor-1/1-626	352	CLSVGMVKEVVRTDSLKGRRLRPSKPKSPQLQEPSPSPSPICMMNALVRALTDSTP--RDLDSRYCP-TDQAAAGTDAEHVQQFYN
Nur77/1-598	327	CLAVGMVKEVVRTDSLKGRRLRPSKPKQ-----PPDASPANLLTSLVRAHLDGSGPSTAKLDYSKFQELVLPFHGKEDAGDVQQFYD
Nurr1/1-598	409	LLTGSMEIIRGWAEEKIPGFADLPKADQDQLLFESAFLELFVRLRLAYRSNPVEGKLIFCNGVVLHRLQCVRGFGGEWIDSI VEFSSNLQNMNID
Nor-1/1-626	440	LLTASIDVSRSWAEKIPGFTDLPKEDQTLLESAFLELFVRLRLSIRSNATAEDKFVFCNGLVHLRLQCLRGFGGEWLDISKDFSLNLQSLNLD
Nur77/1-598	409	LLSGSLEVIRKWAEEKIPGFAELSPADQDQLLLESFAFLELFILRLAYRSKPGEGKLIFCSGLVHLRLQCARGFGDWIDSI LAFSRSLHSLLLVD
Nurr1/1-598	500	ISAFSCIAALAMVTERHGLKEPKRVEELQNKIVNCLKDQVTFNNGGLNRPNYLSKLLGKLPRLTLCTQGLQRIFYLKLKLEDLVPPPAIDK
Nor-1/1-626	531	IQALACLALSALSMITERHGLKEPKRVEELCNKITSCLKDQSK---GQALEPTESKVLGALVELRKICTLGLQRIFYLKLKLEDLVSPPSIDK
Nur77/1-598	500	VPAFACLALVLIIDRHLQEPVRRVEELQNRIASCLKEHVAAVAGEPQPASCLSRLLGKLPRLTLCTQGLQRIFYLKLKLEDLVPPPIIDK
Nurr1/1-598	591	LFLDLPFF
Nor-1/1-626	619	LFLDLPFF
Nur77/1-598	591	IFMDLPFF

LKLKLEDLVPPPAIDK Secuencia consenso de sumoilación ( $\Psi$ KXE)

**Figura 13. Conservación del motivo consenso para sumoilación ( $\Psi$ [I/V/L]KXE) en la subfamilia NR4A.** Alineamiento realizado con Clustal W. Las lisinas presentes dentro de motivos consenso de sumoilación son Lys91 y Lys577 para Nurr1, Lys85 y Lys605 para Nor-1, Lys102 y Lys577 para Nur77. Números de acceso NCBI: Nurr1: NP 006177.1, Nor-1: NP 008912.2, Nur77: NP 002126.2.

En todos los integrantes de la familia, se observaron dos sitios consenso para sumoilación, el primero de ellos cercano al extremo N-terminal en el dominio de transactivación y el segundo muy próximo al C-terminal en el LBD. Las lisinas sugeridas como blanco de sumoilación para Nor-1 son Lys85 y Lys605; mientras que para Nur77 podría tratarse de los residuos Lys102 y Lys577.

Tanto en el caso de Nurr1 como en el de Nor-1, los posibles motivos de sumoilación son canónicos (revisado en Johnson, 2004). En cambio, en el motivo de Nur77 cercano al N-terminal (Lys102), el primer residuo es una fenilalanina, el cual no es de los residuos considerados como consenso, pero también es un aminoácido hidrofóbico.

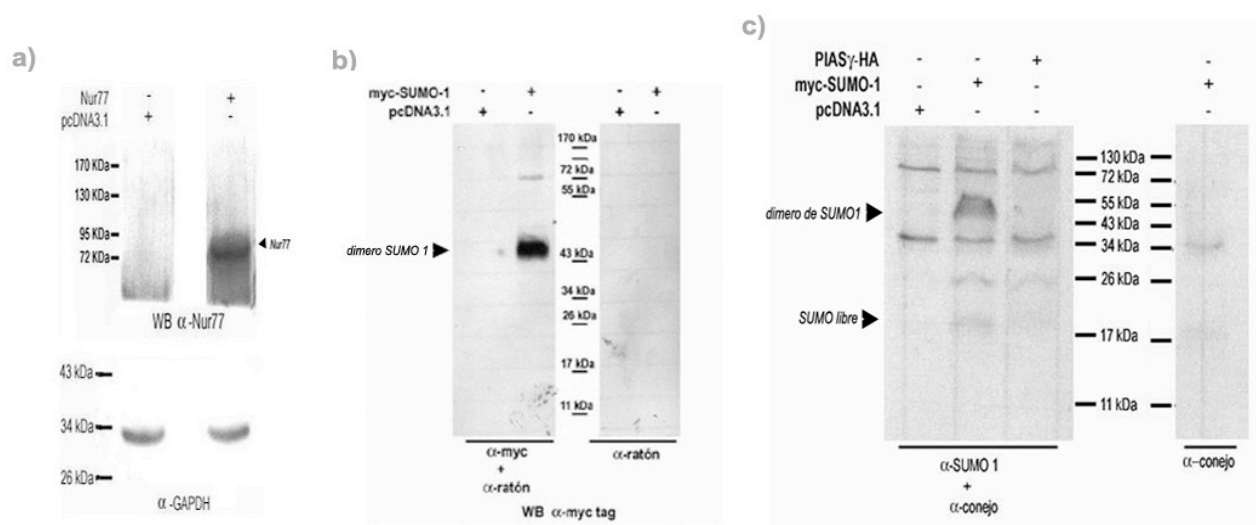
El segundo motivo consenso conservado para los tres miembros, cercano al C-terminal, es completamente canónico en las tres secuencias. El reconocimiento de estos posibles sitios de sumoilación en la familia NR4A, en particular en Nur77, favorece la hipótesis de la modificación por SUMO.

### C. Sumoilación de Nur77 *in vitro*.

La detección por bioinformática de los sitios consenso de sumoilación requirió la comprobación experimental de la sumoilación de Nur77, ya que el motivo consenso de sumoilación involucra una secuencia muy pequeña que fácilmente podría estar presente en la estructura primaria de una proteína, sin que necesariamente esté sujeta a modificarse por SUMO.

Inicialmente buscamos si Nur77 es susceptible a sumoilación, para lo que en células HEK293T se sobre-expresaron, mediante transfección transitoria, Nur77 y SUMO-1 (myc-SUMO-1). Puesto que desconocíamos los niveles endógenos de las enzimas necesarias para el proceso de conjugación de SUMO, incluimos también la sobre-expresión de Ubc9 (conjugadora E2 para SUMO). Se eligió la enzima conjugadora de SUMO en particular porque es suficiente para la sumoilación *in vitro* (revisado en Hay, 2005).

Iniciamos probando la especificidad de los anticuerpos como se muestra en la **Figura 14**. Nur77, es una fosfoproteína que va de los 65 a los 75 KDa (revisado en Hsu *et al.*, 2004). Las células a partir de las cuales se obtuvieron los extractos proteicos presentan una cantidad de Nur77 basal muy baja (**Figura 14a**, columna izquierda), así que se recurrió a la sobre-expresión de Nur77 por transfección transitoria para incrementar la cantidad de la proteína, como se observa en la **Figura 14a** (columna derecha).



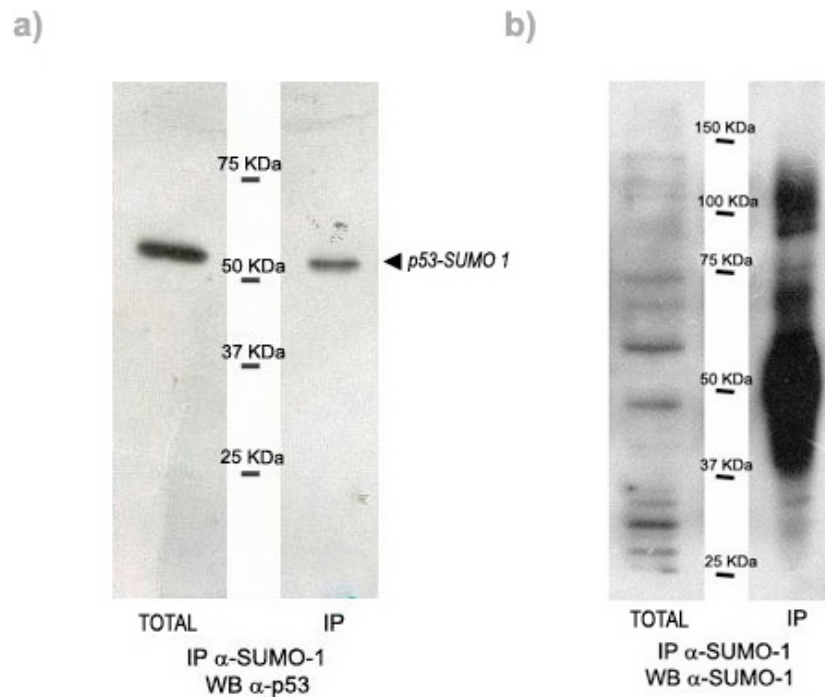
**Figura 14. Especificidad de anticuerpos.** A través de Western blot se probó la especificidad de los anticuerpos requeridos: a) anti-Nur77, parte superior; anti-GAPDH como control de carga, parte inferior; b) detección de SUMO-1 (myc-SUMO-1) a través del

epítoto myc; c) anti-SUMO-1, el panel de la izquierda indica la especificidad de anti-SUMO-1, el panel de la derecha prueba la limpieza del anticuerpo secundarios (anti-conejo). Las proteínas totales empleadas fueron obtenidas a partir de células previamente transfectadas con vectores que expresan los genes indicados en la parte superior de cada panel. Geles desnaturalizantes al 8% para a) y 15 % para b) y c).

SUMO 1 es un péptido de 101 aminoácidos con un peso de 17-20 KDa, por lo que al estar fusionado al epítoto myc se espera un peso de 19-21 KDa. Sin embargo, al transfectar myc-SUMO—1 y detectarlo con un anticuerpo contra myc, se observó una banda de ~45 KDa (**Figura 14b**) y no una de ~20 KDa que indicaría el SUMO-1 libre. Esto sugiere la presencia de un dímero de SUMO-1, ya que *in vitro* se ha reportado que SUMO-1 puede conjugarse como dímero o hasta trímero (Petrioli *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006).

Dado que la detección del epítoto myc nos permitió observar una banda mayor a la esperada para SUMO-1 libre, se utilizó alternativamente un anticuerpo contra SUMO-1 (**Figura 14c**), lo que detectó la presencia de una banda muy tenue de ~18 KDa al sobreexpresar SUMO-1 (columna central) que podría indicar SUMO libre. Sin embargo, nuevamente se identificó la banda de ~45 KDa y otras de mayor peso que sugieren la presencia de proteínas conjugadas con SUMO-1.

La sumoilación de Nur77 se determinó por inmunoprecipitación para luego detectar por Western blot la presencia de SUMO en la proteína inmunoprecipitada y viceversa. Se inició montando la técnica de inmunoprecipitación, ya que no se había hecho antes en el laboratorio. Para demostrar que podía observarse la sumoilación de proteínas inmunoprecipitadas, se analizó la sumoilación de la proteína p53, ampliamente caracterizada (Rodríguez *et al.*, 1999). Se inmunoprecipitó SUMO-1 y se detectó p53 (**Figura 15**). Juzgamos innecesario hacer el experimento inverso, es decir, inmunoprecipitar p53 y detectar SUMO-1, ya que observamos una banda única, lo cual indica sólo la presencia de la fracción sumoilada de p53 y no hubo bandas inespecíficas. La **Figura 15b**, muestra la presencia de SUMO-1 en los extractos a partir de los cuales se realizó la inmunoprecipitación.



**Figura 15. Detección de sumoilación por inmunoprecipitación.** a) Inmunoprecipitación de SUMO-1 y detección de p53; b) inmunoprecipitación de SUMO-1 y detección de SUMO-1. Los extractos empleados fueron obtenidos a partir de células previamente transfectadas con un vector que expresa p53. La columna nombrada TOTAL indica el extracto total, sin inmunoprecipitar; la columna IP indica la detección de la proteína inmunoprecipitada. El análisis se realizó por Western blot, en geles desnaturalizantes al 12%.

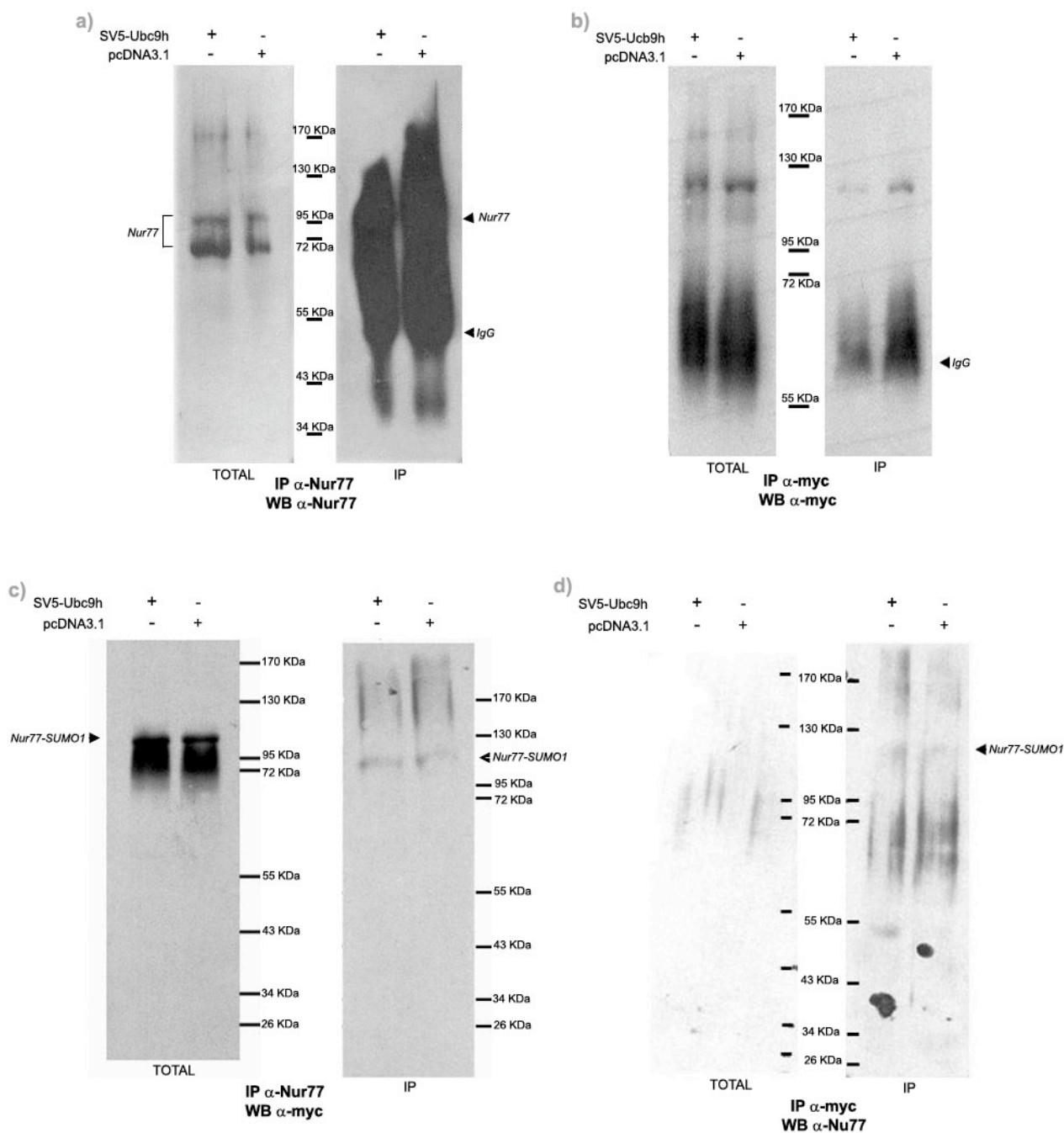
p53, es un factor de transcripción cuyo peso molecular es de ~53 KDa, así que la conjugación de una molécula de SUMO-1 mostraría una banda de ~73 KDa; sin embargo la banda que se observó esta poco arriba de los 50 KDa, es decir, migró más abajo de lo esperado. Puesto que el patrón de migración de una proteína se puede ver afectado por las condiciones del experimento, como es el buffer de lisis, el buffer de corrida, etc., es posible que la banda detectada corresponda a una proteína de tamaño mayor. Dado que éste fue un experimento sólo para probar la funcionalidad de la técnica de inmunoprecipitación, se decidió proseguir con los objetivos.

Para determinar si Nur77 se puede sumoilar, se comparó la presencia de Nur77 sumoilado bajo dos condiciones en la primera se transfectó hUbc9, junto con Nur77 y SUMO-1; en la segunda no se transfectó hUbc9 y en su lugar se usó el vector vacío pcDNA3.1-, para tener la misma proporción de ADN (**Figura 16**). Se obtuvieron extractos proteicos y se inmunoprecipitó a Nur77. En la **Figura 16a** se demuestra la eficiencia de la inmunoprecipitación de Nur77. Lo mismo fue hecho para probar la inmunoprecipitación de SUMO-1-myc (**Figura 16b**).

En las proteínas totales del experimento en el que se inmunoprecipitó Nur77 y se reveló con anti-Nur77 (**Figura 16a**), fue visible una banda de alrededor de 70 KDa que indica la presencia de Nur77 sin conjugar (columnas de la izquierda). En el mismo blot, hubo una banda de 95 KDa que podría tratarse de Nur77 conjugado a una molecular de SUMO 1. Ambas bandas fueron visibles tanto en el TOTAL como en la



IP, sólo que en la fracción IP está muy saturada, lo que hace difícil su distinción, pero la zona se observa engrosada.



**Figura 16. Sumoilación de Nur77 *in vitro*, en presencia o ausencia de hUbc9.** Comprobación de la presencia de las proteínas inmunoprecipitadas (a y b); a) inmunoprecipitación de Nur77 y detección de la misma; b) inmunoprecipitación de SUMO-1 (anti-myc) y detección de la misma (anti-myc); c) inmunoprecipitación de Nur77 y detección de SUMO-1 (anti-myc); d) inmunoprecipitación de SUMO-1 (anti-myc) y detección de Nur77, inmunoprecipitación inversa. Los extractos empleados fueron obtenidos a partir de células previamente transfectadas con vectores que expresan los genes myc-SUMO-1 y Nur77 en todos los casos. En la parte superior de cada panel se indica la transfección de Ubc9h o pcDNA3.1(-). La columna nombrada TOTAL indica las proteínas totales, sin inmunoprecipitar; la columna IP indica la detección de la proteína inmunoprecipitada. El análisis se realizó por Western blot, en geles desnaturalizantes al 8%.

En el experimento donde se prueba la inmunoprecipitación de SUMO-1 a través de anti-myc (**Figura 16b**), se puede apreciar claramente la banda de ~120 KDa, posiblemente por la sobre-expresión de Nur77. Quizá la cantidad de otras proteínas sumoiladas, diferentes a Nur77, fue tan baja que no se alcanzó la sensibilidad para su detección.

El inmunoprecipitado con anti-Nur77 se reveló con el anticuerpo contra el epítotope myc, epítotope con el que está marcado SUMO. Partiendo de que no se ha reportado la formación de cadenas de poli-SUMO-1 *in vivo*, se esperaba una banda de 85-95 KDa, si Nur77 se sumoilaba con una sola molécula de SUMO-1, lo cual no se observó. La **Figura 16c** muestra una banda de ~110 KDa. Si tomamos la banda de 45 KDa que habíamos observado anteriormente (**Figura 14**) como posible dímero de SUMO-1, Nur77 sumoilado tendría un peso aproximado de 110-120 KDa, consistente con lo obtenido (**Figura 14c**). La banda de 70 KDa de la **Figura 14a**, que corresponde a la forma de Nur77 sin conjugar, no es visible en la **Figura 14c**, ya que el anticuerpo usado para revelar en este caso fue dirigido hacia SUMO-1, de manera que sólo se detectó la fracción sumoilada de Nur77 y no la forma sin conjugar.

Para corroborar la presencia de Nur77 sumoilado, se llevó a cabo el experimento inverso donde primero se inmunoprecipitó SUMO-1-myc con el anticuerpo anti-myc y a partir de la proteína inmunoprecipitada se detectó a Nur77 (**Figura 16d**). En este experimento se vio otra vez la banda de ~120 KDa en la fracción inmunoprecipitada; sin embargo, pudo haber degradación de las proteínas totales (TOTAL) durante su manipulación o problemas en el corrimiento del gel, ya que no se observó una banda discreta a la altura donde debería migrar Nur77 y sí se observó un barrido.

También se comparó la sumoilación de Nur77 en presencia o en ausencia de hUbc9. Como se observa en la **Figura 16**, no se encontraron diferencias entre una y otra condición; esto indica que las células tienen suficiente Ubc9 endógena para llevar a cabo el proceso de conjugación de SUMO y no es necesario introducirla de manera exógena.

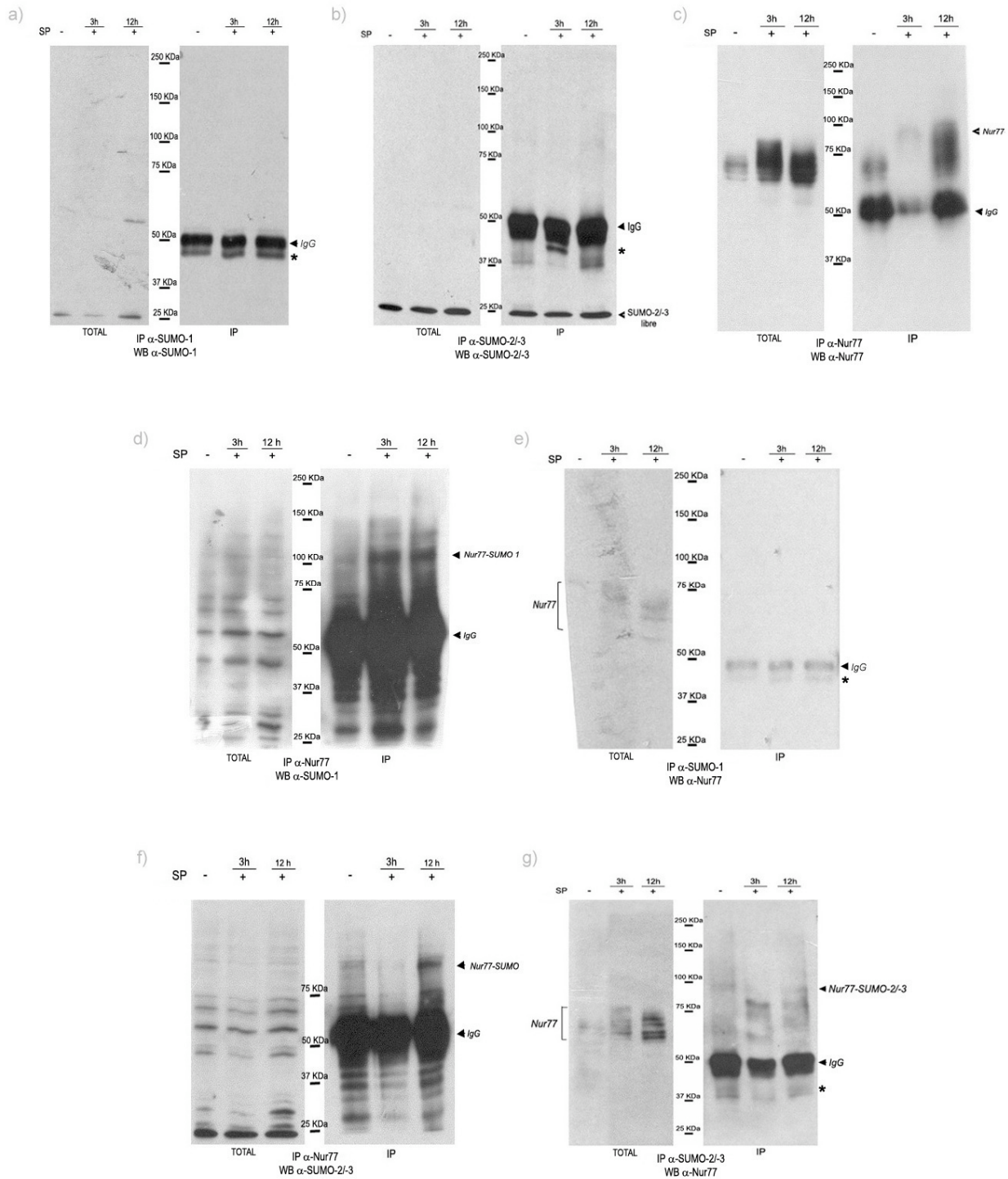
Existía la posibilidad de que la banda de 45 KDa observada al probar el anticuerpo anti-myc (**Figura 14**) asociado a SUMO-1, fuera un artefacto de la construcción usada en la transfección. Por lo tanto, se optó por repetir las inmunoprecipitaciones de Nur77 pero ahora detectando SUMO-1 endógeno con anti-SUMO-1, es decir, sin la sobre-expresión de SUMO. Se observó nuevamente la banda de ~115-120 KDa (dato no mostrado), similar a lo que ocurrió cuando se usó la construcción myc-SUMO-1. La presencia de la misma banda de 45 KDa al detectar SUMO endógeno ó SUMO exógeno apoya la idea de que se están uniendo dos moléculas de SUMO-1 a Nur77 y no se trata de un artefacto por la transfección de myc-SUMO-1.

#### **D. Nur77 se sumoila durante la muerte celular inducida por SP/NK<sub>1</sub>R.**

Los experimentos anteriores indican que Nur77 es sumoilado *in vitro* por un dímero de SUMO-1, fuera de un contexto fisiológico. Para determinar si la modificación de Nur77 sucede durante la muerte no apoptótica mediada por SP/NK<sub>1</sub>R se sobre-expresó Nur77 y NK<sub>1</sub>R en células HEK293T. Por otro lado, resultaba interesante observar si Nur77 podía ser sumoilado por SUMO-2/-3, ya que como se mencionó, SUMO-2/-3 se ha asociado a la respuesta a estrés. Por lo tanto, Nur77 quizá podría ser modificado por los tres SUMOs, como se ha observado en la PML o RanGP1.

Se hizo una cinética de inducción de muerte por SP/NK<sub>1</sub>R, tomando las 3h (cuando el nivel de inducción de Nur77 es el máximo) y 12 h (cuando se había observado mayor grado de sumoilación general). Se sobre-expresó Nur77 porque normalmente es expresado en cantidad muy baja por la línea celular empleada, y NK<sub>1</sub>R fue introducido, pues no es expresado en estas células. Como Nur77 sumoilado se puede detectar en condiciones donde las células sólo poseen SUMO endógeno (dato no mostrado), no se recurrió la sobre-expresión de SUMO ni de Ubc9 (**Figura 17**).

Este experimento se inició probando la inmunoprecipitación de las proteínas SUMO-1, SUMO-2/-3 y Nur77. Para los tres casos, se inmunoprecipitó la proteína y se detectó dicha proteína con un anticuerpo específico (**Figura 17 a-c**). Cuando se inmunoprecipitó SUMO-1 y se reveló contra el mismo, en el extracto total se ve la forma libre, pero no así las proteínas conjugadas, a excepción de una banda de >50 KDa (**Figura 17a**) a las 12 horas de estímulo con SP, donde evidentemente hubo una mayor cantidad de proteína cargada. En la fracción IP, únicamente se observa la IgG, posiblemente porque la cantidad de proteína fue poca como se evidencia en TOTAL. En la inmunoprecipitación de SUMO-2/-3, se observó la forma libre de SUMO tanto en los extractos totales como en la fracción inmunoprecipitada, además de la IgG en la última (**Figura 17b**).



**Figura 17. Sumoilación de Nur77 en el modelo de muerte mediada por SP/NK1R.** a) inmunoprecipitación de SUMO-1 y su detección con anti-SUMO-1; b) inmunoprecipitación de SUMO-2/3 y su detección con anti-SUMO-2/3; c) inmunoprecipitación de Nur77 y su detección con anti-Nur77. Sumoilación de Nur77 por SUMO-1 (d e); d) inmunoprecipitación de Nur77 y detección con anti-SUMO-1; e) Inmunoprecipitación de SUMO-1 y detección con anti-Nur77. Sumoilación de Nur77 por SUMO-2/3 (f y g); f) Inmunoprecipitación de Nur77 y detección con anti-SUMO-2/3; g) inmunoprecipitación de SUMO-2/3 y detección con anti-Nur77. Los extractos empleados fueron obtenidos a partir de células inducidas con SP según los tiempos indicados, previamente transfectadas con vectores que expresan NK1R y Nur77, en todos los casos. La columna nombrada TOTAL indica las proteínas totales, sin inmunoprecipitar; la columna IP indica la detección de proteínas inmunoprecipitadas. El análisis se realizó por Western blot, en geles desnaturizantes al 8%. El anticuerpo anti-SUMO-2/3 reconoce ambas formas. \* indica una banda inespecífica.

En el extracto total de la inmunoprecipitación de Nur77, se corroboró que la cantidad de Nur77 en células sin estimular con SP es muy baja, aún siendo sobre-expresado; a las 3 horas de estimular con la SP, hubo un incremento significativo en la cantidad de proteína detectada, mientras que a las 12 horas, disminuyó (**Figura 17c**, columna izquierda). La fracción inmunoprecipitada presentó un barrido de Nur77, el cual se extendió de los ~60 a los ~75 KDa en ausencia de SP, mientras que se vio recorrido a un rango de ~65-100 KDa en presencia de SP (3 y 12 horas). La proteína cercana a los 100 KDa podría indicar la forma monosumoilada de Nur77 (**Figura 17c**, columna derecha).

Es importante resaltar que el vector de expresión de Nur77 contiene exclusivamente la secuencia correspondiente al marco abierto de lectura del cDNA, bajo el control del promotor viral CMV y con la señal de poliadenilación del antígeno T del virus SV40. Por lo tanto, carece de elementos de regulación propios de Nur77. Esto implica que el aumento en cantidad de proteína detectada durante la activación de la muerte se podría deber a mecanismos postraduccionales, como podría ser la disminución de la degradación.

Finalmente, al inmunoprecipitar Nur77 y revelar con anti-SUMO-1 se observó la banda de aproximadamente ~110 KDa en la fracción inmunoprecipitada, en presencia o ausencia de SP, pero enriquecida en presencia del estímulo (**Figura 17d**). También se observó una banda muy tenue de peso molecular superior a la de ~110 KDa. Al detectar SUMO-2/-3 en la misma inmunoprecipitación (**Figura 17f**), se visualizó una banda cercana a los 100 KDa. Esto indica que Nur77 en estas condiciones es sumoilado tanto por SUMO 1 como por SUMO-2/-3.

Como en los casos anteriores, se llevaron a cabo las inmunoprecipitaciones inversas para corroborar lo observado. Al inmunoprecipitar con SUMO-1 y revelar con anti-Nur77, no se pudo visualizar la banda >100 KDa, pero fue evidente que en esta muestra (TOTAL) hubo muy poca proteína (**Figura 17e**); esto podría explicarse por una baja cantidad de proteínas al momento de hacer el ensayo, pues en TOTAL se observan escasa a Nur77 (columna derecha).

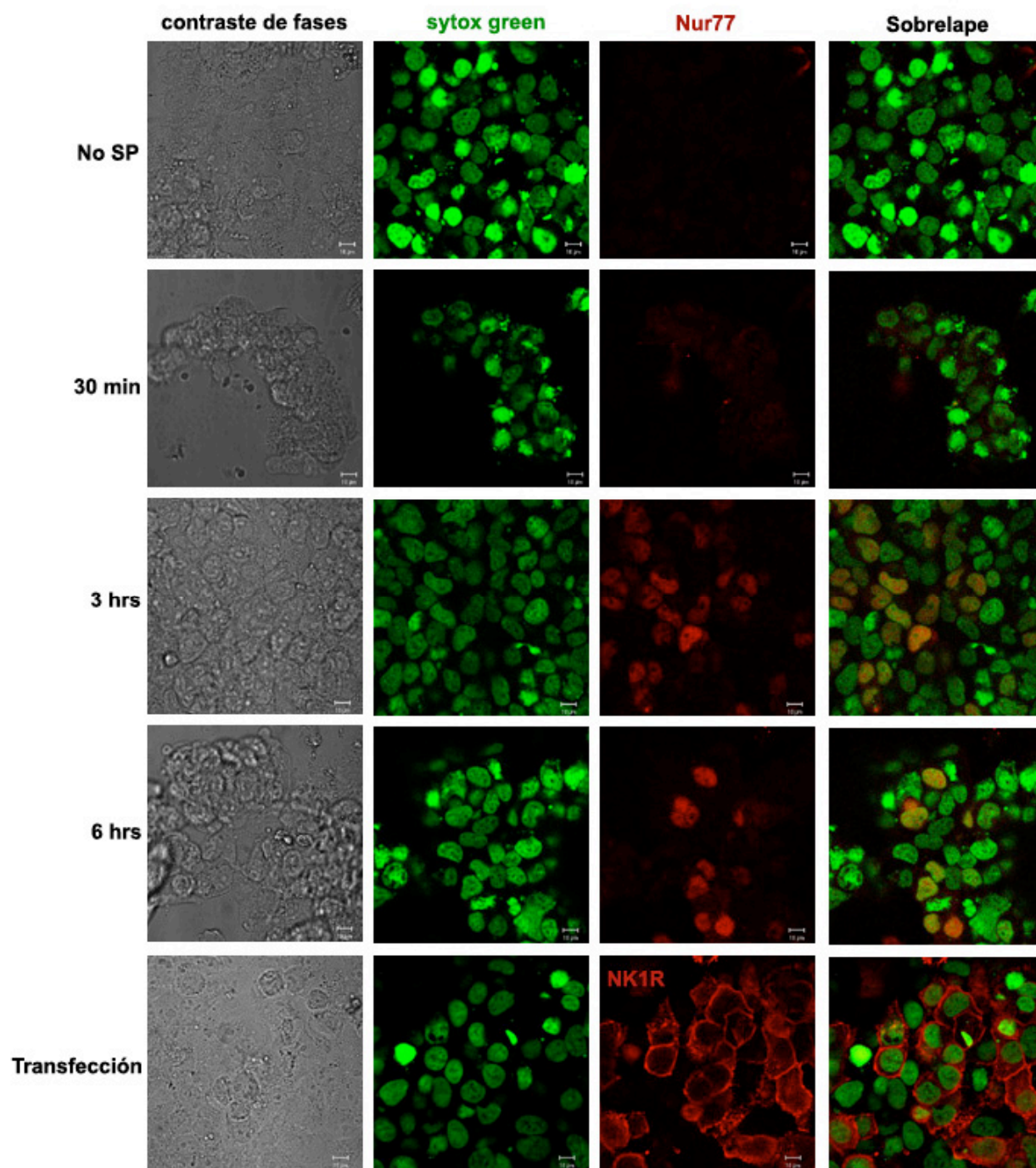
A diferencia de lo ocurrido al inmunoprecipitar con anti-SUMO-1, cuando se inmunoprecipitó con anti-SUMO-2/-3 y se detectó Nur77 se observó una banda próxima a los 100 KDa en ausencia de SP y a las 12 horas posteriores de su adición (**Figura 17g**, columnas derecha). La banda no fue detectada a las 3 horas de estímulo, probablemente debido a la menor cantidad de proteína cargada y un problema en la migración.

#### **E. Distribución intracelular de Nur77 durante la muerte celular inducida por SP/NK<sub>1</sub>R.**

Una vez demostrado que Nur77 es sumoilado, se probó si esta modificación influye en la localización intracelular de Nur77. En estudios preliminares dentro del laboratorio (Gracida, datos no publicados) se había observado la localización nuclear y de forma punteada de Nur77 después de activada la muerte por SP/NK<sub>1</sub>R. Los PML NBs también se observan como estructuras punteadas.

El haber encontrado que Nur77 se sumoila durante la muerte, abrió la posibilidad de la regulación de su actividad al translocarse a cuerpos PML o de otro tipo, como los descritos anteriormente (Léséleuc y

Denis, 2006; Wu *et al.*, 2002). Así, la sumoilación de Nur77 podría favorecer que la proteína se relocalice dentro del mismo núcleo en estructuras subnucleares.



**Figura 18. Cinética de la localización intracelular de Nur77 en células estimuladas con SP, previamente transfectadas con NK<sub>1</sub>R.** Inmunofluorescencia para detectar Nur77 o NK<sub>1</sub>R. Colorante Sytox green para identificación de núcleos. La fila nombrada transfección, indica la eficiencia de transfección de NK<sub>1</sub>R. Imágenes confocales a 63X.

Para estudiar la localización intracelular de Nur77 durante la activación de la muerte celular inducida por SP/NK<sub>1</sub>R, se determinó la localización de Nur77 endógeno por inmunofluorescencia. Las células usadas

para los ensayos de inmunofluorescencia fueron transfectadas transitoriamente con NK<sub>1</sub>R y estimuladas a distintos tiempos con SP (0, 30 min, 3h y 6 h).

En células sin estimular, la cantidad basal de Nur77 fue tan baja que no fue posible su detección (tiempo 0); a los 30 minutos, se observó una expresión baja y un patrón difuso en la célula; a las 3 horas hubo un incremento considerable con respecto a los 30 minutos y una localización mayoritariamente nuclear. A las 6 horas, estuvo evidentemente nuclear, pero un poco disminuido con respecto a las 3 horas. En ninguno de los tiempos, se detectó a Nur77 en estructuras punteadas (**Figura 18**).

## IX. DISCUSIÓN.

La muerte celular programada no apoptótica mediada por SP/NK<sub>1</sub>R ha sido observada en células neuronales (estriadas, corticales e hipocampales) y no neuronales (línea HEK293T); la morfología de células que mueren por este tipo de muerte es distinta a la de células que mueren por apoptosis, ya que no se presenta burbujeo de la membrana plasmática, la condensación de la cromatina es ocasional, se conserva la asimetría de la fosfatidilserina y se no observa fragmentación de ADN, pero sí hay vacuolación citoplásmica. En lo referente a la bioquímica, no hay activación de las caspasas y la introducción de Bcl-X<sub>L</sub>, factor anti-apoptótico, no disminuye de forma significativa los niveles de muerte celular (Castro-Obregón *et al.*, 2002).

El interés por caracterizar este tipo de muerte se debe a que en varios ejemplos de neurodegeneración, como son la enfermedad de Huntington y de Parkinson, se comparten características observadas en la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R. Castro-Obregón *et al.*, 2004, han descubierto algunas de las moléculas implicadas en el proceso y han descifra parcialmente la vía de señalización SP/NK<sub>1</sub>R. En ella, la molécula de andamiaje Arrestina 2 inicia una cascada de fosforilación mediada por las MAPK Rak-1, MEK2 y ERK2; ésta última induce la activación de Nur77, lo cual finaliza en la muerte autofágica.

Nur77 es un elemento clave en dicha cascada de señalización. En el proceso de muerte mencionado se incrementa la expresión del ARNm de Nur77 y se estabiliza su proteína, además la inhibición de su ARNm por ARNi previene la muerte celular. Sin embargo, la participación de Nur77 no sólo se ha descrito en modelos de muerte, sino que también se ha asociado con la sobrevivencia. Por ello es importante estudiar cómo Nur77 es regulado para participar en procesos tan opuestos.

Algunas publicaciones han sugerido una relación entre la fosforilación y la sumoilación de un sustrato, donde se observa una fosforilación seguida de una sumoilación. En algunos ejemplos se ha observado que la mutación del residuo blanco de la fosforilación inhibe la sumoilación de la lisina correspondiente al sitio de sumoilación. Esta relación puede deberse a que la fosforilación introduce carga negativa a la molécula blanco y favorece la sumoilación (revisado en Yang y Grégoire, 2006). Este tipo de regulación podría ocurrir en Nur77 durante la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R, ya que se ha descrito la fosforilación de Nur77 mediada por ERK2 y la estabilización de la primera (Castro-Obregón *et al.*, 2004). La estabilización de ciertas proteínas es una de las funciones de la conjugación de SUMO.

Como una aproximación inicial para evaluar la participación de modificaciones postraduccionales durante la muerte, se comparó el patrón de sumoilación en proteínas totales a diferentes tiempos de iniciada la muerte autofágica inducida por SP/NK<sub>1</sub>R (**Figura 12c**). Aparentemente, los patrones de conjugación de SUMO-1 no varían notablemente, aunque a partir de las 3 horas de estímulo se hace evidente una banda de ~20 KDa que podría ser SUMO-1 libre. Por otro lado, disminuye la intensidad de las bandas de mayor peso molecular, a partir de las 6 horas de estímulo. Podría ser que al incrementarse el tiempo de inducción con SP se desumoilan proteínas y por ello se observa una mayor cantidad de SUMO libre. Lo contrario se observa con SUMO-2/-3, pues se incrementa la intensidad de bandas de elevado peso molecular (**Figura 12d**).



En los experimentos de evaluación de SUMO-2/3 se observó un incremento en bandas menores a los 20 KDa, las cuales podrían tratarse de proteínas que se están procesando durante la muerte autofágica (**Figura 12d**). Lo anterior podría indicar que el mecanismo de autofagia actúa de manera distinta al mecanismo de muerte apoptótica, la cual es regulada por una cascada de proteólisis (realizada por caspasas). En el caso de la muerte autofágica las caspasas no son necesarias; sin embargo, podrían participar otro tipo de proteasas, como las lisosomales.

Se ha reportado una mayor variación en la conjugación de SUMO-2/-3 que en la conjugación de SUMO-1, ante condiciones de estrés; por ejemplo, la sumoilación de c-Myb por SUMO-2/-3 se incrementa ante estrés metabólico, osmótico y calórico (Sramko *et al.*, 2006). Al considerar a la muerte celular como una condición de estrés, se esperaba que la variación en los patrones de sumoilación por SUMO-2/-3 fuera mayor que la variación en los patrones de conjugación de SUMO-1, como efectivamente se observó (**Figura 12**). Saitoh y Hinchey (2000), reportan variación en la conjugación de SUMO-2/-3 a tiempos muy cortos de inducción con el estímulo estresante, lo que no fue observado en nuestro caso. Más bien, se observaron diferencias en los tiempos más largos de estimulación con SP.

El proceso de sumoilación-desumoilación se ha descrito como altamente dinámico, es por ello que consideramos que las diferencias observadas se deben a la conjugación y desconjugación de moléculas de SUMO; sin embargo, desconocemos si la estimulación con SP induce la transcripción de SUMO, pudiendo tratarse de un incremento en la expresión de SUMO más que cambios en la conjugación, y por lo tanto se observa más péptido libre en el caso de SUMO-1 y un incremento en el péptido conjugado, en el caso de SUMO-2/-3. Aunque no sabemos de un ejemplo donde se haya observado regulación transcripcional de SUMO, no podemos descartar esta posibilidad.

Por otro lado, la cinética de sumoilación general corroboró lo descrito (Saitoh y Hinchey, 2000) en cuanto a los altos niveles de SUMO-2/-3 libre presentes en las células. Hay mayor cantidad de SUMO-2/-3 libre que de SUMO-1 (**Figura 12**), mientras que las formas conjugadas de SUMO 1 son preferentemente de elevado peso molecular. Sin embargo, para hacer concluyentes los datos anteriores, se requieren los controles de carga correspondientes que faltaron.

Todos los miembros de la familia NR4A, incluido Nur77, presentan dos motivos consenso de sumoilación, el primero de ellos cercano al extremo N-terminal, dentro del dominio de transactivación, y el segundo está próximo al C-terminal, donde se ubica el LBD (**Figura 13**). Ambos dominios son regiones donde Nur77, así como Nurr1 y Nor-1, interactúan con otras moléculas.

La secuencia del motivo consenso de sumoilación propuesto para Nur77 ubicado en su extremo N-terminal (FKFE) no es canónica porque inicia con fenilalanina y mayoritariamente se ha observado la presencia de residuos altamente hidrofóbicos como son la isoleucina, valina o leucina, al inicio del motivo. Sin embargo, esto no debería ser un impedimento para la sumoilación de Nur77, ya que la sumoilación de p53

está probada en la Lys389, residuo ubicado dentro de una secuencia no canónica de sumoilación que también inicia con una fenilalanina (Rodríguez *et al.*, 1999).

En el dominio de transactivación de los miembros de la familia NR4A, hay una secuencia de activación variable (AF-1), donde se ha observado la unión de cofactores para la actividad transcripcional (Flaig *et al.*, 2005). La Lys102 predicha como blanco de sumoilación para Nur77 se ubica dentro del dominio de transactivación, por lo que podría tener efecto en la actividad transcripcional de Nur77, ya que la interacción de SUMO en esta región podría interferir con la interacción entre una molécula co-activadora y el receptor nuclear, de manera que la actividad transcripcional de Nur77 podría verse disminuida; o por el contrario, la molécula de SUMO podría interferir en la asociación de un co-represor a Nur77, permitiendo la actividad transcripcional que de otra manera sería reprimida.

El LBD, donde se ubica el segundo motivo consenso de sumoilación predicho para Nur77, posee un segundo factor de activación variable (AF-2) que está ligeramente asociado con la actividad transcripcional del receptor (Davis *et al.*, 2003); pero además, están presentes tres señales de exportación nuclear (revisado en Hsu *et al.*, 2004), las cuales al ser mutadas, evitan la exportación nuclear de Nur77, ocasionando su permanencia en el núcleo. Así, la sumoilación en la Lys577 de Nur77, podría tener efectos en la actividad transcripcional de Nur77, al interferir o favorecer la interacción de cofactores; pero también podría afectar la localización intracelular de Nur77, como podría ser una re-localización nuclear o incluso su salida del núcleo.

En el caso de Nurr1 se ha observado que al interactuar con PIAS $\gamma$ , E3 ligasa para SUMO, disminuye la transcripción dependiente de Nurr1; sin embargo, al mutar la Lys91 se observa un incremento fuerte de la transcripción dependiente de Nurr1, mientras que la mutación de la Lys577 disminuye su actividad transcripcional. La inhibición de PIAS $\gamma$  en la transcripción dependiente de Nurr1 sigue ocurriendo en ambas mutantes, por lo que el mecanismo de inhibición podría ser independiente de sumoilación, aunque falta probar la doble mutante para descartar una posible compensación al perderse alguna de las lisinas blanco. (Galleguillos *et al.*, 2004).

La literatura reporta mayoritariamente la inhibición de la actividad transcripcional de los factores sumoilados (revisado en Verger *et al.*, 2003), salvo el factor de transcripción p53 (Rodríguez *et al.*, 1999). Siguiendo esta idea, lo lógico es pensar en la inhibición de la actividad transcripcional de Nur77 al sumoilarse, lo cual no ocurre. Esto podría indicar que la sumoilación se da en un sitio que no influye en la actividad transcripcional o que el efecto de la modificación más que represivo favorece la transcripción dependiente de Nur77. Una tercera alternativa es que, dependiendo con quien interactúe Nur77, se dé la expresión de algunos genes y la represión de otros.

Con base en nuestros antecedentes, parece más favorable la sumoilación de Nur77 en la Lys577, dentro del LBD, puesto que en esta región se ubican tres señales de exportación nuclear y aunque desconocemos el efecto de la sumoilación en este tipo de dominios, la alteración podría resultar en la

inhibición de las mismas, al evitar la exportación nuclear y así favorecer la conservación de la proteína dentro del núcleo. Esto es congruente con que a las 6 horas Nur77 está activo transcripcionalmente.

La permanencia de Nur77 en el núcleo podría representar una diferencia entre la muerte autofágica y la muerte apoptótica, ya que se ha visto la translocación de Nur77 al citoplasma ante estímulos apoptóticos, donde se asocia a la mitocondria (Li *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004), lo que no es de esperarse que ocurra en la muerte autofágica puesto que no se libera el citocromo c. Debe notarse que la salida de Nur77 del núcleo no es en su totalidad (20-25% se transloca) durante la muerte apoptótica y que además hay varios ejemplos en los que se ha mostrado que la actividad transcripcional de Nur77 es requerida para la apoptosis. Para estudiar el papel de la sumoilación durante la muerte autofágica sería necesario determinar el sitio modificado, lo cual forma parte de las perspectivas.

Hasta ahora, la capacidad de formar cadenas de poli-SUMO ha sido reportado preferencialmente para SUMO-2/-3, pues dentro de su misma secuencia de aminoácidos está presente un motivo consenso de sumoilación, involucrando a la Lys11 como punto de anclaje de la cadena, lo cual no ocurre en el caso de SUMO-1 (Tatham *et al.*, 2001). Sin embargo, la formación de cadenas de poli-SUMO-1 no puede descartarse del todo, ya que se ha predicho la formación de cadenas de SUMO-1 *in vitro* en lisinas que no se ubican dentro de sitios consenso de sumoilación (Petrioli *et al.*, 2006), mientras que la Lys117 de la hTOP1, *in vitro*, es sumoilada por monómeros, dímeros y trímeros de SUMO-1 que no fueron predichos bioinformáticamente (Yang *et al.*, 2006). Nuestra observación de una banda de 45 KDa correspondiente a SUMO-1 sugiere que puede dimerizar *in vivo* (**Figura 14b y c**).

El no haber detectado una la banda de 17-20 KDa, que indicaría el monómero de SUMO-1, puede deberse a que los niveles de SUMO-1 monomérico son escasos como para poder ser detectados. La presencia de bandas de Nur77 de 70 KDa, 95 KDa y 110-120 KDa (**Figura 16**), aproximadamente, pueden explicarse de acuerdo al número de moléculas de SUMO que se le han conjugado. SUMO y ubiquitina tienen una alta homología estructural, así que si la ubiquitina puede encontrarse como monómero o en cadena, lo mismo que podría estar ocurriendo con las moléculas de SUMO y así Nur77 podría mono o poli sumoilarse.

Dentro del contexto fisiológico del modelo de muerte mediada por SP/NK<sub>1</sub>R (**Figura 17**), se observan las mismas bandas de los ensayos anteriores. De acuerdo a lo observado, Nur77 podría estar siendo sumoilado tanto por SUMO-1 como por SUMO-2/-3. Ya se ha reportado previamente que RanGAP1, PML, c-Myb y HDAC4 pueden ser modificadas por SUMO-1 y SUMO-2/3 (Sramko *et al.*, 2006; Tatham *et al.*, 2001). Entre los SUMO-2/-3 no podemos hacer una diferencia de cuál de los dos sumoila a Nur77 o si lo hacen los dos, ya que al tener una similitud del 96%, los anticuerpos disponibles comercialmente no hacen diferencia entre un péptido y el otro. La sumoilación es observable durante la muerte programada no apoptótica mediada por SP/NK<sub>1</sub>R; sin embargo, es importante determinar si esta modificación postraduccional es relevante en este proceso.

Nur77 se transloca del núcleo a la mitocondria con un efecto pro-apoptótico. En condiciones genotóxicas también se da una relocalización, pero ésta ocurre dentro del mismo núcleo (Léséleuc y Denis, 2006; Wu *et al.*, 2002). Al estimular células con TPA o interferón, la relocalización de Nur77 está asociada a los PML NBs (Wu *et al.*, 2002). Para determinar si la conjugación de SUMO influye en la localización intracelular de Nur77, en la muerte celular programada no apoptótica, se buscó la localización celular de Nur77. La observación de Nur77 en estructuras punteadas dentro del núcleo abriría la posibilidad de su asociación y reclutamiento en cuerpos nucleares PML o alguna otra estructura subnuclear. Nos inclinamos a la asociación de Nur77 con PML NBs ya que son considerados regiones de reclutamiento de proteínas sumoiladas.

Se buscó la localización intracelular de Nur77 por inmunofluorescencia. A las 3 y 6 horas de estímulo con SP. La ubicación fue mayoritariamente nuclear, pero en ninguno de los casos su distribución tuvo una forma punteada (**Figura 18**). El patrón difuso dentro del núcleo de Nur77 podría indicar que no se asocia a estructuras subnucleares, independientemente de cuáles sean. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el anticuerpo empleado para la detección de Nur77, no fue el adecuado, pues en un modelo de muerte apoptótica se observó el requerimiento del extremo N-terminal de Nur77 para la asociación con cuerpos nucleares (Léséleuc y Denis, 2006). El anticuerpo utilizado en nuestro trabajo reconoce precisamente el extremo N-terminal, de manera que podría estar ocurriendo que el anticuerpo no reconoce a Nur77 asociado a cuerpos nucleares al no estar expuesto el N-terminal de la proteína y da un patrón difuso al reconocer exclusivamente las moléculas libres de Nur77.

La falta de asociación de Nur77 a estructuras subnucleares reforzaría la participación del receptor nuclear como factor de transcripción dentro de la muerte mediada por SP. Hablando particularmente de los PML NBs, además de ser considerados sitio de reclutamiento de proteínas sumoiladas, también parecieran ser regiones de secuestro de factores de transcripción, llevando a su inhibición transcripcional. En cambio, resultados del grupo muestran que Nur77 mantiene su actividad transcripcional a las 6 hrs de iniciada la muerte celular. Sin embargo, hay que considerar que en aumento la cantidad de ejemplos en los que la sumoilación potencia de la actividad transcripcional, como ocurre con p53, quien además de estar sumoilado es reclutado en cuerpos PML. Así, la actividad transcripcional y la asociación a PML NBs no son hechos mutuamente excluyentes.

## X. PERSPECTIVAS.

Para consolidar los resultados del presente trabajo faltaría hacer lo siguiente:

**A.** Verificar el patrón de sumoilación durante la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R, con los respectivos controles de carga. Además, podrían emplearse inhibidores de las proteínas desumoiladoras, como NEM (N-etilmaleimida) (Babic *et al.*, 2006), para hacer más evidente la conjugación de SUMO a ciertas proteínas.

**B.** Analizar la distribución subnuclear de Nur77 durante la muerte. También, sería conveniente emplear un anticuerpo contra Nur77 que reconozca el extremo C-terminal, y así descartar por completo o mostrar si la sumoilación de Nur77 ante el estímulo de muerte por SP relocaliza al factor de transcripción en estructuras subnucleares, como los cuerpos nucleares PML.

Para determinar si la modificación postraduccional de Nur77 por SUMO es relevante en el proceso de muerte mediada por SP se estudiaría si la muerte ocurre en ausencia de la sumoilación de Nur77. La inhibición de la sumoilación de Nur77 puede lograrse con el empleo de DTT (dithiothreitol), compuesto que se encarga de la inhibición de la formación del enlace tioéster, necesario en la activación de SUMO, aunque es muy general (Bohren *et al.*, 2004). También podría recurrirse a la transfección de dominantes negativas de las proteínas SENPs, encargadas de la maduración y desconjugación de las moléculas de SUMO.

Por otro lado, para inhibir la sumoilación de Nur77 podría hacerse mutagénesis sitio dirigida de las lisinas propuestas como blanco de SUMO en Nur77 (Lys102 y Lys577) y observar qué ocurre con la muerte mencionada. Ya que la forma silvestre endógena de Nur77 podría influir en incluso enmascarar el fenotipo de las mutantes, en conjunto podría usarse RNAi específico para la molécula endógena o podría probarse en células nulas en Nur77, como sería MEF Nur77<sup>-/-</sup>. Esta estrategia tendría ventaja sobre la anterior en cuanto a la especificidad, pues implicaría únicamente la inhibición de la sumoilación de Nur77 sin interferir en la sumoilación general de proteínas.

La generación de formas mutantes de Nur77 no sumoilables ayudarían a probar si la conjugación de SUMO afecta la actividad transcripcional de receptor y/o su localización intracelular y así influir en la muerte autofágica, pues la Lys102 se ubica dentro del dominio de transactivación y la Lys577 está dentro del dominio de unión a ligando que presenta señales de exportación nuclear.

Nur77 es fosforilado en la Thr142 por ERK2 (Slagsvold *et al.*, 2002), en distintas condiciones. Sin embargo el residuo modificado en la muerte autofágica podría ser diferente. Para probar la existencia de una relación fosfo-sumoil en Nur77, inicialmente debe identificarse el residuo que es fosforilado durante la muerte mediada por SP/NK<sub>1</sub>R. Una vez conocido el residuo de Nur77 al que se adiciona el grupo fosfato, podría determinarse la relación entre la fosforilación y la sumoilación de Nur77.

La manera más sencilla de identificar las modificaciones postraduccionales de Nur77 es poder hacer una distinción entre la proteína endógena y la exógena introducida por transfección. Así, pueden transfectarse las formas mutadas de Nur77 y observar que ocurre con ella, sin el ruido que ocasionaría la forma endógena. Para ello sería muy útil la adición de un epítoto sintético a Nur77 como puede ser FLAG, cuya secuencia no está presente en biomoléculas, disminuyendo la inespecificidad probable si existiera una secuencia similar a la del epítoto dentro de la célula.

Además, una vez corroborada la existencia de patrones diferenciales de sumoilación en la muerte inducida por SP, podría hacerse espectrometría de masas de las bandas que aparecieran o desaparecieran a lo largo de la cinética y determinar de qué moléculas se trata. Con esta información se podrían proponer el mecanismo por el cual Nur77 provoca la muerte autofágica.

## XI. CONCLUSIONES.

- A. El patrón de sumoilación general de proteínas varía durante la muerte autofágica.
- B. Nur77 se sumoila, tanto por SUMO-1 y SUMO-2/-3.
- C. Nur77 no se detectó en estructuras subnucleares.

## XII. GLOSARIO

Akt: miembro de las proteínas MAP cinasas.

Aos1-Uba2: heterodímero que actúa como enzima E1 para SUMO. Homólogo a SAE1-SAE2, en levadura.

Apaf-1: participa en la vía apoptótica intracelular (Apoptotic peptidase activating factor 1).

Apg: homólogos de Atg en levadura.

Aut: homólogos de Atg en levadura.

Bak: miembro de la familia Bcl-2 con actividad pro-apoptótica.

Bcl-2: familia de proteínas importantes para la regulación de la apoptosis (B-cell lymphoma 2).

Bcl-X<sub>L</sub>: miembro de la familia Bcl-2 con actividad anti-apoptótica.

Bax: miembro de la familia Bcl-2 con actividad pro-apoptótica.

Cdk5: cinasa dependiente de ciclina (cyclin-dependent kinase 5). Reguladora del ciclo celular.

COS-1: fibroblastos de mono, inmortalizados. Expresan el antígeno T de SV40.

DO11.10: hibridomas de células T.

ERK2: miembro de las MAP cinasas (extracellular signal-regulated kinases).

H460: células cancerosas de pulmón.

HA: hemaglutinina. Proteína viral.

HEK293T: células embrionarias de riñón humano con antígeno T de SV40 (human embryonic kidney).

Llamadas también 293T.

HeLa: células epiteliales originarias de cáncer cervical.

I $\kappa$ Ba: inhibidor del NF- $\kappa$ B.

LNCaP: células cancerosas de próstata.

LPS: lipopolisacáridos. Lípidos de membrana celular bacteriana.

Mdm2: E3 ligasa de ubiquitina para p53.

MEK2: miembro de las MAP cinasas, encargada de fosforilar a ERK1/EKR2 (mitogen-activated protein kinase kinase 2).

NF- $\kappa$ B: factor de transcripción  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B). Asociado con proliferación.

NGFI-B: familia de genes B inducida por el factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor-induced clone B). Homólogos en rata a la familia de Nur77.

PIAS: familia de proteínas inhibidoras de proteínas STAT (protein inhibitor of activated STATs).

PC12. Células derivadas del feocromocitoma de rata. Modelo para estudio principalmente de sistema nervioso.

Raf-1: es una cinasa de serinas/treoninas perteneciente a las MAP cinasa, río debajo de Ras. Fosforila y activa a MEK1 y MEK2.

RanBP2: proteína nuclear Ran, relacionada a Ras (Ran Ras-related small nuclear protein). Componente del complejo del poro nuclear.



RelA<sup>-/-</sup>: Rel A es un gen que codifica para la sintetasa (p)ppGpp asociada a ribosomas.

RING: dominio presente en E3 ligasas para ubiquitina.

SAE1-SAE2: heterodimero que actúa como enzima E1 para SUMO. Homólogo a Aos-Ub2, en mamíferos.

SENP: proteasas específicas de sentina (SUMO), en mamíferos (sentrin-specific proteases).

Siz: familia de proteínas homólogas a E3 ligasas para SUMO, en levadura.

SP-RING: dominio en E3 ligasas para SUMO similar a dominio RING de E3 ligasas para ubiquitina.

STAT: familia de factores de transcripción (signal transducer and activator of transcription).

SMT3: homólogo a SUMO, en levadura.

Tor: receptor de rapamicina. En mamíferos se conoce como mTor.

TR3: homólogo a Nur77 en humano.

TRF2<sup>-/-</sup>: TRF2 es un componente de un complejo proteína/DNA telomérico. Su inactivación lleva a apoptosis inducida por p53.

TUNEL: método para detectar fragmentación de ADN (terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

U87: línea celular derivada de glioblastoma humano.

Ubc9: E2 conjugadora para SUMO.

ULP: dominio conservado en las proteínas desumoiladoras.

Ulp: proteasas específicas para proteínas similares a ubiquitina (ubiquitin-like protein-specific protease).

Homólogas a SENP, en levadura.

U2OS: células derivadas de osteosarcoma humano.

Vps: homólogos de Atg en levadura.

### XIII. REFERENCIAS

- Babic, I.; E. Cherry y D. J. Fujita. SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis. *Oncogene*, 2006: 4953-4964.
- Bohren, K. M.; V. Nadkarni, J. H. Song, K. H. Gabbay y D. Owerbach. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I *Diabetes mellitus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 27233-27238.
- Castro-Obregón, S.; G. del Rio, S. F. Chen, R. A. Swanson, H. Frankowski, R. V. Rao, V. Stoka, S. Vesce, D. G. Nicholls y D. E. Bredesen. A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 2002, 9: 807-817.
- Castro-Obregón, S.; R. V. Rao, G. del Rio, S. F. Chen, K. S. Poksay, S. Rabizadeh, S. Vesce, X. Zhang, R. A. Swanson, y D. E. Bredesen. Alternative, nonapoptotic programmed cell death mediation by arrestin 2, ERK2 y Nur77. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 17543-17553.
- Chen, Y.; E. McMillan-Ward, J. Kong, S. J. Israels y S.B. Gibson. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 2007: 1-12.
- Clarke, P. G. Developmental cell death: morphological diversity and multiples mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 1990, 181: 195-213.
- Cuervo, A. M. Autophagy: many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004, 263: 55-72.
- Davis, I. J.; T. G. Hazel, R. H. Chen, J. Bienis y L. F. Lau. Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Molecular Endocrinology*, 1993, 7: 953-964.
- Desterro, J. M. P.; M. S. Rodríguez y R. T. Hay. SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Molecular Cell*, 1998, 2: 233-239.
- Edinger, A. L. y C. B. Thompson. Death by design: apoptosis, necrosis y autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 16: 663—669.
- Farbman, A. I. Electron microscope study of palade fusion in mouse embryos. *Developmental Biology*, 1968, 18: 93-116.
- Ferraro, E. y F. Cecconi. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 462: 210-219.
- Ferri, K. F y G. Kroemer. Mitochondria- the suicide organelles. *BioEssays*, 2001, 23: 111-115.
- Flaig, R.; H. Greschik, C. Peluso-Iltis y D. Moras. Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 19250-19258.

- Fogal, V.; M. Gostissa, P. Sandy, P. Zacchi, T. Sternsdorf, K. Jensen, P. P. Pandolfi, H. Will, C. Schneider y G. del Sal. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *The EMBO Journal*, 2000, 19: 6185-6195.
- Galleguillos, D.; A. Verchiola, J. A. Fuentealba, V. Ojeda, K. Álvarez, A. Gómez, y M. E. Andrés. PIAS $\gamma$  repress the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nur1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 2005-2011.
- Glass, C. K. y S. Ogawa. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature*, 2006, 6: 44-54.
- Gozyacik, D. y A. Kimchi. Autophagy as cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 2004, 23: 2891-2906.
- Green, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, 2005, 121: 671-674.
- Hara, T.; K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Yohko Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano y N. Mizushima. Suppression of basal autophagy in neuronal cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 2006, 441: 885-889.
- Hay, R. T. SUMO: a history of modifications. *Molecular Cell*, 2005, 18: 1-12.
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407: 770-776.
- Hsu, H. C.; T. Zhou y J. D. Mountz. Nur77 family of nuclear hormone receptors. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 2004, 3: 413-423.
- Inoue, H.; H. Nojima y H. Okayama. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, 96 (1): 23-28.
- Johnson, E. S. Protein modification by SUMO. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, 73: 355-382.
- Kamitani, T; K. Kito, H. P. Nguyen, H. Wada, T. F. Kamitani y E. T. H. Yeh. Identification of three major sumoylation sites in PML. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (41): 26675-26682.
- Katagiri, Y. K. Takeda, Z. Yu, V. J. Ferrans, K. Ozato y G. Guroff. Modulation of retinoid signaling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nature Cell Biology*, 2000, 2: 435-440.
- Kerscher, O.; R. Felberbaum y M. Hochstrasser. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.*, 2006, 22: 159-180.
- Kerscher, O. SUMO junction -what's your function? New insights through SUMO- interacting motifs. *The EMBO Journal*, 2007, 8 (6): 550-555.
- Kim, K. I.; S. H. Baek y C. H. Chung. Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *Journal of Cellular Physiology*, 2002, 181: 257-268.
- Kim, S. O.; K. Ono, P. S. Tobias y J. Han. Orphan nuclear receptor Nur77 is evolved in caspase-independent macrophage cell death. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 197 (11): 1441-1452.

- Komatsu, M.; S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami y K. Tanaka. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 2006, 441: 880-884.
- Laudet, V. 2005. Nuclear receptors genes. [archivo en línea] *Encyclopedia of Life Sciences*. Disponible en <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0006154/current/pdf>
- Léséleuc, L. y F. Denis. Nur77 forms novel nuclear structures upon DNA damage that cause transcripcional arrest. *Experimental Cell Research*, 2006, 312: 1507-1513.
- Li, H.; S. K. Kolluri, J. Gu, M. I. Dawson, X. Cao, P. D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J. A. Fontana, J. C. Reed y X. Zhang. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science*, 2000, 289: 1159-1164.
- Lin, B.; S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed y X. K. Zhang. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, 2004, 116: 527-540.
- Love, J. D. 2006. Nuclear receptors and disease. [archive en línea] *Encyclopedia of Life Sciences*. Disponible en <http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0006024/current/abstract>
- Mahajan, R.; C. Delphin, T. Guan, L. Gerace y F. Melchior. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 1997, 88: 97-107.
- Malaguarnera, L. Implications of apoptosis regulator in tumorigenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2004, 23: 367-387.
- Masuyama, N.; K. Oishi, Y. Mori, T. Ueno, Y. Takahama y Y. Gotoh. Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 32799-32806.
- Michaels, J. E.; J. T. Albright y D. I. Patt. Fins structural observations on cell death in the epidermis of the external gills of larval frog, *Rana pipiens*. *The American Journal of Anatomy*, 1971, 132 (3): 301-317.
- Mikolajczyk, J.; M. Drag, M. Békés, J. T. Cao, Z. Ronai y G. S. Salvesen. Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-specific proteases: profiling the specificities and activities of human SENPs. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (36): 26217-26224.
- Mukhopadhyay, D. y M. Dasso. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32 (6): 286-295.
- Müller, S.; C. Hoegen, G. Pyrowolakis y S. Jentsch. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2001, 2: 202-209.
- Owerbach, D.; E. M. McKay, E. T. H. Yeh, K. H. Gabbay y K. M. Bohren. A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2005, 337: 517-520.
- Pattingre, S.; L. Espert, M. B. Piechaczyk y P. Codogno. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin I complex. *Biochimie*, 2008, 90: 313-323.

- Petrioli, P. G.; B. Raught, X. D. Zhang, R. Rogers, J. Aitchison, M. Matunis y R. Aebersold. Automated identification of SUMOylation sites using mass spectrometry and SUMmOn pattern recognition software. *Nature methods*, 2006, 3:533-539.
- Quartara, L. y C.A. Maggi, The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides*, 1997. 31: 537-563.
- Rodríguez, M. S.; J. M. P. Desterro, S. Lain, C. A. Middgley, D. P. Lane y R. T. Hay. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *The EMBO Journal*, 1999, 18: 6455-6461.
- Salzgeber, B. y R. Weber. The regression of the mesonephros in the chick embryo. A study of acid phosphatase and cathepsin activity. Biochemical, histochemical, and electron microscopic observations. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1966, 15: 397-419.
- Saitoh, H. y J. Hinchev. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 6252-6258.
- Scheib, C. W. y D. S. Corwin. Dirofilariasis in a 2-year-old Husky-shepherd cross in Maine. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician*, 1977, 72: 1594-1595.
- Scheib, A. Fine structure of the Müllerian duct in the chick embryo: cytoplasmic lesions of the male duct in regression. *Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 1965, 260: 1252-1254.
- Schin, K. S. y U. Clever. Lysosomal and free acid phosphatase in salivary gland of chironomus tentans. *Science*, 1965, 150: 1053-1055.
- Schin, K. S. y U. Clever. Ultrastructural and cytochemical studies of salivary gland regression in chironomus tentans. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1968, 86: 262-279.
- Schmidt, D. y S. Müller. PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, 60: 2561-2574.
- Schwartz, D. C. y M. Hochstrasser. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28: 321-328.
- Schwartzman, R. A. y J. A. Cidlowski. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine reviews*, 1993, 14: 133-151.
- Seet, B. T.; I. Dikic, M. Zhou y T. Pawson. Reading protein modifications with interaction domains. *Molecular Cell Biology*, 2006, 7: 473-483.
- Shen, T. H.; H. K. Lin, P. P. Scaglioni, T. M. Yung y P. P. Pandolfi. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Molecular Cell*, 2006, 24: 331-339.
- Slagsvold, H. H.; A. C. Ostvold, A. B. Fallgren y R. E. Paulsen. Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate of kinase ERK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 291: 1146-1150.

- Smiley, G. R. y A. D. Dixon. Fine structure of midline epithelium in the developing palate of the mouse. *Anatomical Record*, 1968, 161: 293-310.
- Sramko, M; J. Markus, J. Kabát, L. Wolff y J. Bies. Stress-induced inactivation of c-Myb transcription factor through conjugation of SUMO-2/3 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 40065-40075.
- Susuki, S.; N. Susuki, C. Mirtsos, T. Horacek, E. Lye, S. K. Noh, A. Ho, D. Bouchard, T. W. Mak y W. C. Yen. Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 2003, 100: 8276-8280.
- Takács-Vellai, K; A. Bayci y T. Vellai. Autophagy in neuronal cell loss: a road to death. *BioEssays*, 2006, 28: 1126-1131.
- Tsujimoto, Y. y S. Shimizu. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 2005, 12: 1528-1534.
- Tatham, M. H.; E. Jaffray, O. A. Vaughan, J. M. P. Desterro, C. H. Botting, J. H. Naismith y R. T. Hay. Polymeric chain of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 35368-35374.
- Turmaine, M.; A. Raza, A. Mahal, L. Margiarini, G. P. Bates y S. W. Davies. Non apoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 2000, 97: 8093-8097.
- Verger, A.; J. Perdomo y M. Crossley. Modification with SUMO: a role in transcriptional regulation. *The EMBO Journal*, 2003, 4: 137-142.
- Wang, Z.; G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Lui, H. Xu, N. P. C. Walker y T. Perimann. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*, 2003, 423: 555-560.
- Wikipedia. 2008. Nuclear receptor. [web en línea, actualizado 11-03-2008]. Disponible en [http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear\\_receptors](http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptors) [acceso 12-03-2008]
- Winoto, A. y D. R. Littman. Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell*, 2002, 109: S57-S66.
- Wu, W. S.; Z. X. Xu, R. Ran, F. Meng y K. S. Chang. Promyelocytic leukemia protein PML inhibits Nur77-mediated transcription through specific functional interactions. *Oncogene*, 2002, 21: 3925-3933.
- Xie, Z. y D. J. Klionsky. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 2007, 9: 1102-1109.
- Xu, Y.; S. O. Kim y J. Han. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 19179-19187.
- Yang, X. Y. y S. Grégoire. A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Molecular Cell*, 2006, 23: 779-786.

- Yang, M; C. T. Hsu, C. Y. Ting, L. F. Liu y J. Hwang. Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 8264-8274.
- Zhao, B. X.; H. Chen, N. Lei, G. Li, W. Zhao, Y. Zhan, B. Liu, S. Lin y Q. Wu. p53 mediates the negative regulation of Mdm2 by orphan receptor TR3. *The EMBO Journal*, 2006, 25: 5703-5715.