



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA MOLECULAR

ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR
AUTOFÁGICA MEDIADA POR EL RECEPTOR
NUCLEAR Nur77

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

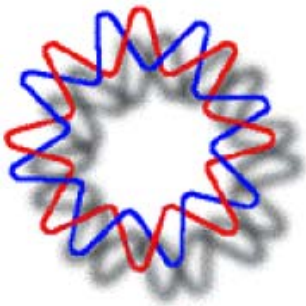
PRESENTA:

BIOL. GABRIELA ZÁRRAGA GRANADOS

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Susana Castro Obregón

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I. ÍNDICE

II. AGRADECIMIENTOS	4
III. RESUMEN	5
IV. ABREVIATURAS	6
V. INTRODUCCIÓN	8
A. Muerte celular programada	9
B. Muerte autofágica	12
C. Receptor nuclear Nur77	18
1. Nur77 en muerte y supervivencia celular	19
D. Sumoilación	20
1. Implicaciones de la sumoilación	23
2. Formas de inhibir la sumoilación	25
VI. ANTECEDENTES	27
A. Muerte celular programada no apoptótica inducida por SP/NK ₁ R	27
B. Muerte celular programada inducida por IGF1R	28
C. Muerte autofágica mediada por Nur77	29
D. Modificaciones postraduccionales de Nur77	29
1. Fosforilación de Nur77	29
2. Sumoilación de Nur77	30
VII. HIPÓTESIS	32
VIII. OBJETIVOS GENERALES	32
IX. MÉTODOS	33
A. Biología molecular	33
1. Mutagénesis sitio dirigida	33
2. Western blot	36
3. Ensayo de actividad transcripcional	41
B. Biología celular	43
1. Mantenimiento de la línea celular HEK293T	43
2. Congelamiento	44
3. Descongelamiento	44
4. Transfección de ADN	45

5. Modelos de muerte inducida por SP/NK ₁ R	48
6. Modelos de muerte inducida por IGF1R	48
7. Determinación de viabilidad celular por exclusión de azul de tripano	48
X. RESULTADOS	49
A. La muerte mediada por Nur77 requiere de proteínas de la maquinaria central de la autofagia	49
B. La inactivación de Nur77 disminuye la cantidad de LC3 en la muerte inducida por IGF1R	50
C. Evaluación del papel de la sumoilación durante la muerte celular mediada por Nur77	53
1. La inhibición general de la sumoilación disminuye la muerte autofágica	53
2. La sobreexpresión de Ubc9 bloquea la muerte autofágica	58
D. Generación de proteínas mutantes de Nur77 en sitios predichos para la sumoilación o fosforilación	61
1. Inserción de FLAG N-terminal a Nur77	61
2. Generación de proteínas mutantes de Nur77 posiblemente no sumoilables	63
3. Generación de proteínas mutantes de Nur77 en la Thr143	64
E. La actividad transcripcional de Nur77 parece inhibirse por sumoilación y fosforilación	65
XI. DISCUSIÓN	67
A. La muerte autofágica mediada por Nur77 se lleva a cabo por la vía canónica, dependiente de Atg7 y Beclina- 1	67
B. La inactivación de Nur77 disminuye la cantidad de LC3 en la muerte inducida por IGF1R	67
C. Distintos inhibidores generales de la sumoilación tienen efectos diferentes	68
D. Análisis de las proteínas mutantes de Nur77 potencialmente no sumoilables	70
E. Identificación del sitio de fosforilación de Nur77 durante la muerte autofágica	71
XII. CONCLUSIONES	73
XIII. PERSPECTIVAS	73
XIV. APÉNDICE I: SOLUCIONES	74
XV. REFERENCIAS	82

II. AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Susana Castro, por sus enseñanzas, consejos y correcciones; así como por su interés en que mi desarrollo profesional fuera integro.

Al Dr. Luis Covarrubias por su apoyo durante mi estancia dentro del laboratorio.

A mi comité tutorial: la Dra. Martha Vázquez y la Dra. Susana López, por las sugerencias a lo largo del trabajo.

A mi comité sinodal: el Dr. Gustavo Pedraza, el Dr. Federico Sánchez, la Dra. Rosa Navarro y el Dr. Ramón González por los comentarios y correcciones tanto al trabajo como al escrito.

A la M. en C. Concepción Valencia por su apoyo técnico.

A la Dra. María Estela Andrés y Cristian Arredondo por las facilidades y su apoyo durante mi estancia en la Universidad Pontificia Católica de Chile, particularmente en los análisis de actividad transcripcional.

A los miembros y ex-miembros del laboratorio: Paula, Yvette, Gilda, Rocío Hernández, Niurka, Elida, Dámaris y Chris Wood; por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, que hicieron mi estancia más agradable.

A mi mamá y mi hermana, por ser mi apoyo y soporte a lo largo de mi vida, sobre todo cuando las cosas se tornan difíciles.

A mis grandes amigos: Anai, Gema, Israel, Raúl y Celina, por los regaños cuando fueron necesario, los ánimos cuando la frustración parecía ganar, la ayuda aún cuando no sabía que la necesitaba y el cariño puesto en lo anterior.

A los donativos CONACyT 106598, ICGEB MEX06/03, PAPIIT IN221909 a SCO; así como la beca otorgada por CONACyT 255401.

III. RESUMEN:

La muerte celular autofágica es una forma alternativa de muerte con morfología diferente a la apoptosis, en la que predomina la formación de vesículas de doble membrana mediante la participación de genes asociados a la autofagia (Atg) y que no requiere de la activación de caspasas. Este tipo de muerte ocurre en el desarrollo embrionario y también funciona como un mecanismo de seguridad para eliminar células dañadas o malignas, cuando la apoptosis se encuentra bloqueada.

Previamente mostramos que el receptor nuclear Nur77 (también conocido como NR4A1, entre otros nombres) induce muerte celular no apoptótica con morfología autofágica. Aquí mostramos que las proteínas de la maquinaria central de la autofagia Atg7 y Beclina-1 son necesarias para la muerte inducida por Nur77, lo que sugiere a Nur77 como un modulador importante de la muerte celular autofágica.

Entre las actividades descritas para Nur77 están la regulación de la apoptosis, de la proliferación y de la expresión de genes relacionados al metabolismo. Posiblemente la función específica de Nur77 en cada circunstancia es determinada por modificaciones post-traduccionales. En este trabajo proponemos que la actividad pro-autofágica de Nur77 se regula por sumoilación, ya que durante la activación de la muerte: 1) Nur77 se estabiliza y una proporción se transloca fuera del núcleo, efectos observados en otras proteínas sumoiladas; 2) la inhibición general de la sumoilación disminuye la muerte autofágica significativamente; 3) Nur77 se sumoila y mutaciones en las lisinas predichas como blanco de sumoilación aumentan su actividad transcripcional.

Además, dentro de este trabajo se generaron las herramientas para el estudio de la fosforilación de Nur77 en la muerte autofágica.

IV. ABREVIATURAS:

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AHPN: (retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid), retinoide sintético. 3-Cl-AHCP es un análogo de AHPN.

ARN: ácido ribonucleico.

Atg: genes relacionados con autofagia.

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

ATP: trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate).

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

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

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

HEK293T: células embrionarias de riñón humano con antígeno T de SV40 (human embryonic kidney). Llamadas también 293T.

HeLa: células epiteliales originarias de cáncer cervical.

IGF1R: receptor 1 del factor de crecimiento tipo insulina (insulin-like growth factor receptor 1).

LAMP-2A: glucoproteína 2 asociada a la membrana lisosomal (lysosome-associated membrane glycoprotein 2).

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

LC3-I: LC3 activada.

LC3-II: conjugación LC3-PE.

LPS: lipopolisacáridos. Lípidos de membrana celular bacteriana.

MAP1LC3: cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos (microtubule-associated protein 1 light-chain 3). Comúnmente abreviada como LC3.

MCP: muerte celular programada.

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

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

NDG1 y 2: genes 1 y 2, río abajo de Nur77 (Nur77 Downstream Gene 1 and 2)

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

NF- κ B: factor de transcripción κ B (nuclear factor κ B).

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

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.

NK₁R: 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).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

PE: fosfatidiletanolamina (phosphatidiletanolamine).

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

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

PML: proteína de leucemia promielocítica (promyelocytic leukemia).

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

ΨKXE: secuencia consenso de sumoilación.

ψKxExxSP: secuencia consenso de sumoilación y fosforilación.

PtdIns(3)P: fosfoinositol-3-fosfato (Phosphatidilinositol 3-phosphate).

P-X-S/T-P: secuencia consenso de fosforilación por ERK.

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

RNAi: ARN de interferencia

RIP: proteína cinasa que interactúa con el receptor (receptor-interacting protein)

SAE1-SAE2: heterodímero que actúa como enzima E1 para SUMO.

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

siRNA: ARN pequeño de interferencia.

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

STUbl: ligasa de ubiquitina dirigida por SUMO (SUMO-targeted Ub ligase).

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

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

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

TNFR1: receptor 1 similar al factor de necrosis tumoral (tumoral necrosis factor-like receptor).

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

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

Ubl: similar a ubiquitina (Ubiquitin like).

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor).

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

V. INTRODUCCIÓN:

La muerte celular es un mecanismo necesario que favorece la supervivencia del individuo. En el organismo debe existir un balance entre la proliferación y la muerte celular, pues cuando este balance se rompe, se originan padecimientos múltiples; por ejemplo, el cáncer aunque es un padecimiento multifactorial, presenta una clara predominancia de la proliferación sobre la muerte, por el contrario, cuando predomina la muerte sobre la proliferación, se desencadenan enfermedades neurodegenerativas.

La muerte puede clasificarse como pasiva o activa, entendiéndose como pasiva aquella muerte descontrolada en la que las células mueren inesperadamente por algún daño mecánico agudo o por el agotamiento energético repentino, lo que se refleja en la pérdida de la integridad celular y la inflamación de la zona dañada, a lo que se ha denominado clásicamente como necrosis. Por otro lado, la muerte celular activa o programada se lleva a cabo de manera organizada y requiere la síntesis de diversas proteínas que permiten su ejecución sin afectar a las células vecinas; es decir, permite la degradación de tejidos específicos, como ocurre durante la morfogénesis para el modelamiento y eliminación de estructuras, permite el recambio celular al eliminar células anómalas y controlar el número celular; etc. (Figura 1) (revisado en Fink y Cookson, 2005, Syntichaki y Tavernarakis, 2003).

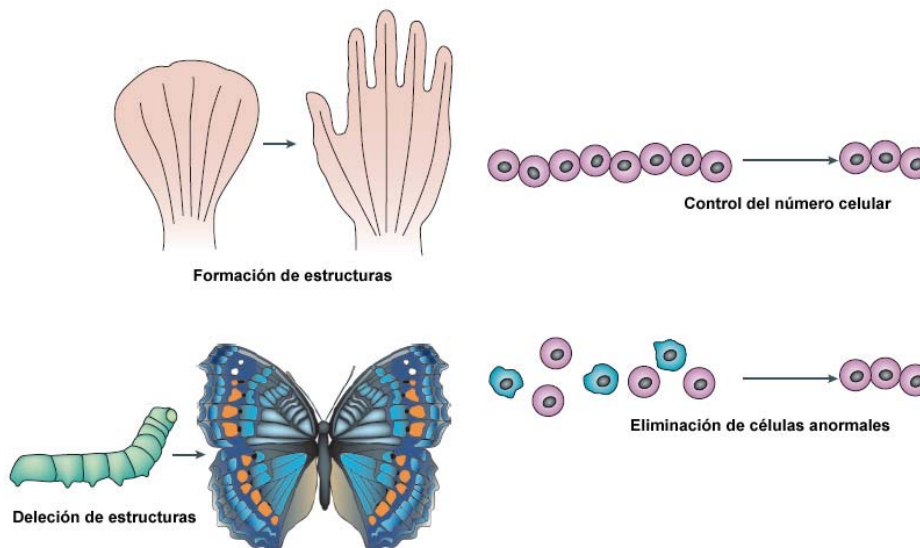


Figura 1. Ejemplos de participación de la muerte celular (Modificada de Baehrecke, 2002).

Alrededor de las dos últimas décadas la concepción de la muerte celular ha cambiado, existen ejemplos que sugieren que la necrosis también podría ser regulada, además de que la apoptosis ha dejado de ser vista como un sinónimo de muerte celular programada y han surgido conceptos nuevos como: cornicación, anoikis, oncosis, necroptosis, excitotoxicidad, etc. (revisado en Kroemer *et al.*, 2009); sin embargo, algunos de ellos son

muy particulares o poco frecuentes y probablemente podrían ser reagrupados en una clasificación más general, por lo cual no se retomarán en este trabajo.

A. Muerte celular programada

Inicialmente, la muerte celular programada se clasificó en tres tipos, de acuerdo a las características morfológicas observadas en el desarrollo embrionario (Schweichel y Merker, 1973).

La muerte celular tipo I o apoptótica ha sido la más estudiada debido a que ocurre en mayor proporción. Se caracteriza por la pérdida de uniones intercelulares y el redondeo celular, el burbujeo de la membrana plasmática que permanece integra hasta el final del proceso con lo cual evita la inflamación, la translocación de fosfatidilserina de la capa interna a la capa externa de la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos que son degradados *in vivo* por fagocitos, etc. Estos cambios morfológicos se llevan a cabo por la activación de proteasas llamadas caspasas (**Tabla 1**) (revisado en Fink y Cookson, 2005, Kroemer *et al.*, 2009).

Tabla 1. Algunas consecuencias por la activación de caspasas		
Molécula blanco	Función	Consecuencia
Laminas	Proteínas de andamiaje y estructurales de cubierta nuclear.	Encogimiento y fragmentación nuclear.
Frodina	Proteína de citoesqueleto.	Pérdida de forma celular.
Componentes de complejos de adhesión focal	Establecimiento de uniones intercelulares y con membrana basal.	Pérdida de uniones intercelulares.
Gelsolina	Enzima despolimerizante de actina.	Burbujeo de la membrana celular.
PAK2	Cinasa de la familia p21.	Formación de cuerpos apoptóticos.
ICAD	Inhibidor de la ADNasa CAD.	Fragmentación internucleosomal del ADN.

Las caspasas son proteasas con una cisteína en su sitio activo y cortan el sustrato después de reconocer un tetrapéptido que termina con un residuo de ácido aspártico. Estas proteasas se dividen en iniciadoras y ejecutoras, de acuerdo al punto en la vía de señalización en la que participan (**Tabla 2**). También existen caspasas inflamatorias que regulan la expresión de citocinas y pueden no estar relacionadas con la muerte celular (revisado en Li y Yuan, 2008, Taylor *et al.*, 2008).

Además de las caspasas, las proteínas de la familia Bcl-2 son reguladoras importantes de la apoptosis (**Tabla 2**), asociadas a la vía intrínseca (detallada adelante), y recientemente se ha comprobado su participación en la regulación de la autofagia al interactuar con Beclina-1, una proteína de la maquinaria autofágica (revisado en Scarlatti *et al.*, 2009). Las proteínas Bcl-2 tienen en común la presencia de dominios BH (homólogos a Bcl-2). Los miembros que regulan negativamente la apoptosis tienen conservados los dominios BH1-BH4, mientras que los reguladores positivos, tienen conservados sólo los primeros tres dominios. También existen proteínas

conocidas como BH3, porque es el único dominio que conservan con el resto de la familia Bcl-2 y participan como moléculas pro-apoptóticas (revisado en Taylor *et al.*, 2008).

Tabla 2 . Principales proteínas reguladoras de la apoptosis		
Familia	Función	Miembros
Caspasas	Iniciadoras	-2, -4, -8, -9, -10 y -12
	Ejecutoras	3, -6 y -7
	Inflamatorias	1, -5 y -11
Bcl-2	Anti-apoptóticas	Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-B y Mcl-1
	Pro-apoptóticas	Bax, Bak y Bok
	BH3 (pro-apoptóticas)	Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa y Puma

Se han descrito dos vías principales para la activación de la apoptosis, la vía extrínseca en la que la señal inductora se origina fuera de la célula y la vía intrínseca, cuando la activación se da intracelularmente (**Figura 2**). Existe una tercera vía que induce la apoptosis asociada con estrés al retículo endoplásmico. En la vía extrínseca participan receptores de muerte (familia TNFR1, Fas, DR3, TRAILR1 y NGFR), los cuales son proteínas transmembranales que cuando su ligando interactúa con ellos, se induce una cascada de señalización que lleva a la formación de un complejo donde participan moléculas adaptadoras, que permiten el reclutamiento y activación de caspasas iniciadoras (cas-8 y -10), que a su vez procesa a caspasas ejecutoras (cas-3 y -7) (**Figura 2**) y éstas actúan sobre sus blancos para iniciar el desmantelamiento celular (revisado en Li y Yuan, 2008, Taylor *et al.*, 2008).

Los principales inductores de la vía intrínseca son el daño a ADN y algunos compuestos citotóxicos, esto ocasiona que moléculas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bax y Bak) formen un poro en la membrana externa mitocondrial para la liberación del citocromo c, que junto con la procaspasa-9 y Apaf-1, forman un oligómero conocido como apoptosoma en el que se procesa la procaspasa-9, se activa a la caspasa 3 y se desencadena la muerte celular (**Figura 2**) (revisado en Degterev y Yuan, 2008, Li y Yuan, 2008, Taylor *et al.*, 2008).

La manera como pueden convergir las vías extrínseca e intrínseca es por el procesamiento de Bid por la caspasa-8, para generar el péptido t-Bid, que es translocado a la mitocondria donde contribuye a la oligomerización de Bax-Bak, para formar poros en la mitocondria y liberar el citocromo c (**Figura 2**); es decir, con la inducción de la vía extrínseca se ejecuta la apoptosis por la vía intrínseca (revisado en Degterev y Yuan, 2008, Li y Yuan, 2008, Taylor *et al.*, 2008).

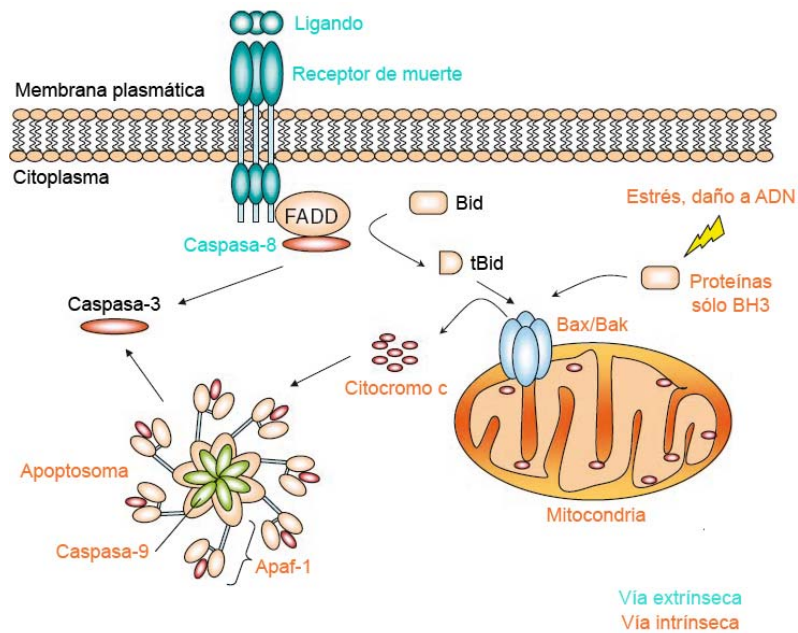


Figura 2. Vías apoptóticas extrínseca e intrínseca. Esquema simplificado, en el que se indican las principales moléculas involucradas. El mecanismo se detalla en el texto (Modificado de Li y Yuan, 2008).

La muerte tipo II o autofágica y la muerte tipo III o citoplásmica son dos formas por las que la célula muere organizadamente, pero sus características morfológicas son distintas a la apoptosis. Ambos tipos de muerte presentan una alta vacuolación citoplásmica, que a su vez es la diferencia principal entre ellas. Las vesículas observadas en la muerte tipo III no tienen asociación con la actividad lisosomal, lo que sí ocurre en la muerte tipo II (revisado en Degterev y Yuan, 2008, Schweichel y Merker, 1973).

Existen grupos de investigación que proponen la denominación de necrosis programada o necroptosis para la muerte tipo III, pues hay ejemplos que sugieren que la necrosis puede darse de manera regulada. Morfológicamente, tanto la necrosis clásica como la necrosis programada se caracterizan por la hinchazón de organelos y de la célula en sí, estrés oxidativo masivo asociado a la disfunción mitocondrial y sobre todo permeabilidad de la membrana plasmática, no observada en los otros tipos de muerte. Aparentemente la única manera para distinguir la necrosis clásica de la necroptosis es que la necroptosis es regulada por señales intracelulares (revisado en Degterev y Yuan, 2008, Loos y Engelbrecht, 2009). Entre las moléculas que se han visto asociadas con la necroptosis se encuentran algunos receptores de muerte ($TNF\alpha$) y receptores similares a Toll, necrostatinas y en algunos casos interviene la cinasa RIP1. El mecanismo por el cual se dispara la necroptosis aún no es muy claro, se ha observado que cuando participa RIP1, ésta se transloca a la mitocondria y posteriormente hay disfunción del organelo (revisado en Degterev y Yuan, 2008, Kroemer *et al.*, 2009).

Los tipos neuronales que mueren en padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, la de Huntington (Turmaine *et al.*, 2000), la de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (Dal Canto y

Gurney, 1994) o isquemia (Koike *et al.*, 2008), entre otros, presentan características morfológicas distintas a la apoptosis y más bien similares a la muerte autofágica o necrótica (**Figura 3**). Aunque durante mucho tiempo existió el debate de que la autofagia fuera un mecanismo de muerte o el último intento de la célula por sobrevivir, actualmente todo apunta a que durante la neurodegeneración hay fallas en la autofagia que favorecen dichos padecimientos, razón por la cual resulta importante estudiar dicho mecanismo.

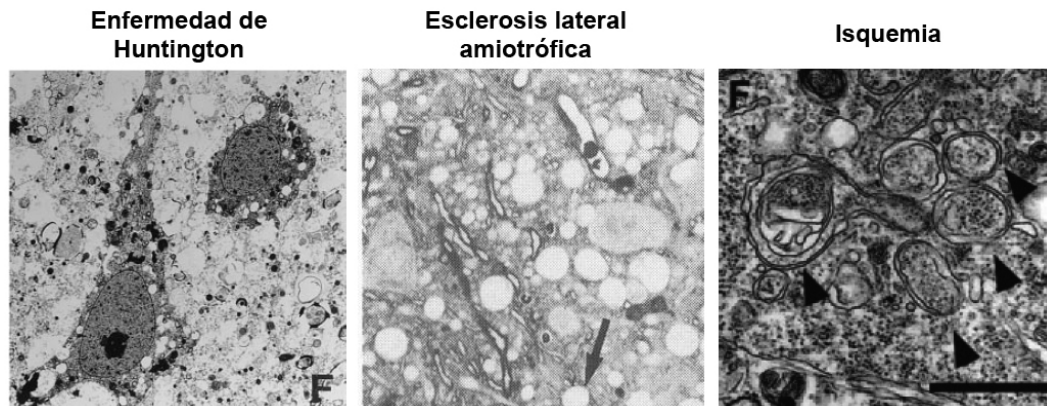


Figura 3. Morfología no apoptótica en distintas enfermedades neurodegenerativas. Tejido *pos mortem* de un paciente con enfermedad de Huntington (Modificado de Turmaine *et al.*, 2000); cuerno anterior de ratón con esclerosis lateral amiotrófica, la flecha señala una vesícula típica del padecimiento (Modificado de Dal Canto y Gurney, 1994); autofagosomas en neuronas piramidales del hipocampo afectadas por isquemia (Modificado de Koike *et al.*, 2008).

B. Muerte autofágica.

La autofagia es un proceso celular autodigestivo que permite la degradación de proteínas de vida media larga, contender con la carencia de nutrientes, la eliminación de estructuras disfuncionales o la degradación de parásitos intracelulares, mediante la participación de los lisosomas (revisado en Klionsky *et al.*, 2007b). Se han identificado tres tipos de autofagia: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia; siendo el último tipo el más ampliamente estudiado y asociado con la muerte celular programada (revisado en Loos y Engelbrecht, 2009).

En la microautofagia, los lisosomas engullen directamente la porción citoplásmica a degradar, mientras que en la autofagia mediada por chaperonas, hsc70 es la proteína encargada de reconocer al sustrato y con la ayuda de cochaperonas es transportado a la membrana lisosomal, donde LAMP-2A reconoce al complejo sustrato-hsc70 y transloca el sustrato al lumen, para su degradación. Cerca del 30% de las proteínas citosólicas son blancos potenciales de degradación por autofagia mediada por chaperonas, al poseer la secuencia consenso KFERQ necesaria para el reconocimiento por hsc70 (revisado en Dice, 2007, Kaushik y Cuervo, 2009, Klionsky *et al.*, 2007b).

La macroautofagia es el mecanismo por el cual las células degradan organelos disfuncionales completos como mitocondrias (mitofagia) y peroxisomas (peroxifagia), porciones del retículo endoplásmico (reticulofagia) y del núcleo. Al igual que las otras formas de autofagia mencionadas, en la macroautofagia los lisosomas tienen un papel activo; sin embargo, se requiere de la participación de vesículas que se elongan para secuestrar la porción citoplásmica que se degradará, vesículas que no se requieren en los otros tipos de autofagia (revisado en Klionsky *et al.*, 2007a, Klionsky *et al.*, 2007b).

En la macroautofagia, referida en adelante como autofagia por simplificación, se ha identificado la existencia de membranas preformadas en el citoplasma conocidas como fagóforos o preautofagosomas, que al inducirse la autofagia se elongan y maduran, para dar lugar a las vesículas de doble membrana (autofagosomas) distintivas, las cuales posteriormente se fusionarán con los lisosomas (autofagolisosomas), donde las hidrolasas lisosomales degradarán la membrana interna del autofagolisosoma junto con el material que se encuentra en su interior (revisado en Kroemer *et al.*, 2009, Xie y Klionsky, 2007).

Los genes que regulan la autofagia están conservados desde las levaduras hasta los mamíferos. Dichos genes han sido unificados como ATG (ATOPHAGY-related genes), cuyos productos son necesarios en la formación de las vesículas autofágicas (revisado en Mehrpour *et al.*, 2010).

La formación de las vesículas autofágicas puede dividirse en cuatro etapas principales: la iniciación, la nucleación, la elongación y el reciclaje de componentes; en todas ellas participan diferentes proteínas Atg. El complejo Atg1-Atg13-Atg17 (ULK-Atg13-FIP200, en mamíferos) se requiere al inicio (**Figura 4**) como regulador de la magnitud de la autofagia, ya que la hiperfosforilación de Atg13 por mTOR disminuye su afinidad por Atg1, lo que evita la inducción de la autofagia. También se requiere para la adquisición del material membranal, pues en levadura se ha reconocido a Atg1 como necesaria para el reciclaje de Atg9, proteína transmembranal presente en los fagóforos (revisado en Klionsky *et al.*, 2007b, Mehrpour *et al.*, 2010, Pattingre *et al.*, 2008).

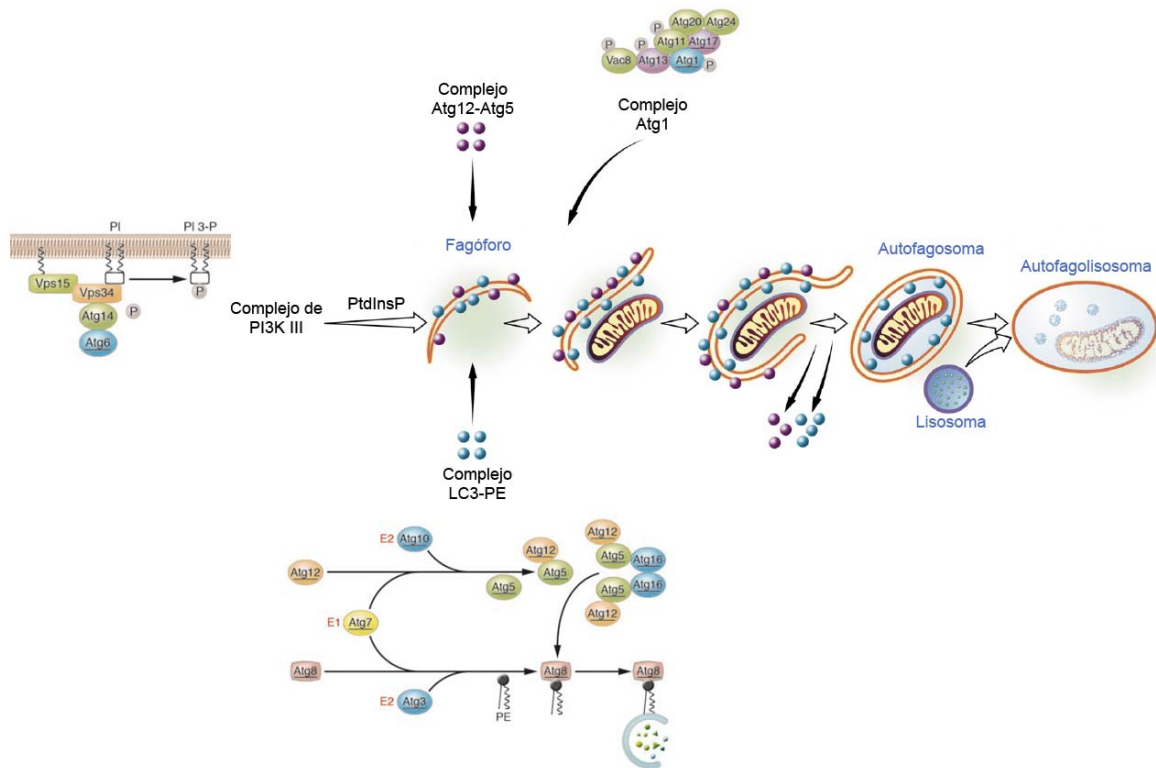


Figura 4. Formación de vesículas autofágicas. Esquema de los principales complejos que participan en la autofagia. El mecanismo se detalla en el texto (Modificado de Pattingre *et al.*, 2008).

En la nucleación participa el complejo de la PI3K tipo III (**Figura 4**), del que forma parte Atg6-Vps34-Vps15-Atg14 (Beclina 1-hVps34-hVps15-Atg14L, en mamíferos); la formación de este complejo está involucrada en la formación de PtdIns3P (Fosfatidilinositol-3-fosfato, componente mayoritario de las membranas autofágicas), el reclutamiento de proteínas de unión a PtdIns3P, como Atg18, y dispara la activación de los sistemas tipo ubiquitina (revisado en Gottlieb y Mentzer, 2010, McEwan y Dikic, 2010, Xie y Klionsky, 2007). La haploinsuficiencia de Beclina 1 se ha ligado fuertemente a la autofagia como mecanismo supresor de tumores, ya que los ratones Beclina-1^{+/-} son viables y fértiles pero presentan una alta incidencia de tumores, que incrementan con la edad; los ratones Beclina-1^{-/-} no son viables (Yue *et al.*, 2003).

En la elongación vesicular participan dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. Atg12 debe ser activada para poder conjugarse a Atg5, la proteína encargada de hacerlo es Atg7 (similar a E1); una vez activada es transferida a Atg5 por Atg10 (similar a E2) para formar el heterodímero Atg5-Atg12 (**Figura 4**), al cual se une Atg16 y se forma un complejo que se asocia a la membrana del preautofagosoma. El complejo de la PI3K tipo III está involucrado en la asociación del multímero Atg5-Atg12-Atg16 a la membrana en elongación (revisado en Gottlieb y Mentzer, 2010, Kadowaki y Karim, 2009, Klionsky *et al.*, 2007b, Tanida *et al.*, 2004, Weidberg *et al.*, 2010).

En el segundo sistema tipo ubiquitina, Atg8 o MAP1LC3 (en mamíferos, referido como LC3 por simplificación) es sintetizada como un precursor, que es procesado por Atg4 para exponer un residuo de Gly, necesario para su posterior conjugación; esta isoforma es conocida como LC3-I. LC3-I es activada por Atg7 (similar a E1) y conjugada a la fosfatidiletanolamina (PE) con la ayuda de Atg3 (similar a E2) (**Figura 4**). El heterodímero LC3-PE es conocido como LC3-II. La formación del complejo Atg5-Atg12-Atg16 regula la conjugación de LC3-II, de hecho se sugiere su función como enzima similar a E3 (revisado en He *et al.*, 2003, Mehrpour *et al.*, 2010, Mizushima y Yoshimori, 2007, Satoo *et al.*, 2009, Tanida *et al.*, 2004).

Como puede notarse, Atg7 es una molécula importante para la elongación de las vesículas autofágicas, ya que participa como enzima activadora en ambos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. De hecho, su deficiencia ha mostrado la importancia de la autofagia en el sistema nervioso, ya que ratones nulos en Atg7 presentan anomalías en el sistema nervioso central, donde se observó un incremento de Atg5 libre y no se detectó LC3-II; además, presentan problemas motores y de comportamiento, debido a la neurodegeneración causada por la ausencia de la autofagia (Komatsu *et al.*, 2006); efectos similares se observan en ratones Atg5^{-/-} (Hara *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se describió una forma alternativa de autofagia en ausencia de Atg7 y Atg5, que requiere de moléculas autofágicas como Beclina-1, Vps34 y Ulk1, pero que prescinde de la participación de LC3-II, Atg12 y Atg16 (Nishida *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que aún hay mucho que estudiar para poder entender los mecanismos por los que pueden formarse los autofagosomas.

Prácticamente todas las proteínas Atg son recicladas. Atg9 cicla de *trans* Golgi a las vesículas autofágicas y viceversa. El complejo Atg5-Atg12-Atg16 es liberado del autofagosoma una vez que los bordes de los autofagosomas en elongación se fusionan. El reclutamiento de LC3-II ocurre tanto en la cara interna como en la cara externa de la vesícula autofágica en elongación; LC3-II de la cara externa puede ser deslipidada por Atg4, mientras que en la cara interna se mantiene unido hasta la fusión de la vesícula autofágica con el lisosoma, y es degradado junto con el material secuestrado; por ello, la detección de LC3-II se usa como marcador de la macroautofagia (revisado en Noda *et al.*, 2009, Xie y Klionsky, 2007).

El interés de este trabajo se centra en la macroautofagia, debido a que es el tipo de autofagia que está relacionado con la muerte celular. La autofagia tiene una relación estrecha con la apoptosis (**Figura 5**). Se reconocen básicamente tres formas en las que la apoptosis y la autofagia se relacionan funcionalmente: cuando la apoptosis o la autofagia se dan independientes una del otra, cuando ambos procesos son cooperativos o cuando hay inhibición de la apoptosis o la autofagia y en consecuencia el otro mecanismo es compensatorio (revisado en Kroemer *et al.*, 2005, Scarlatti *et al.*, 2009, Tsujimoto y Shimizu, 2005).

La muerte autofágica puede darse independientemente de la activación de la apoptosis, como ocurre en el desarrollo de *Drosophila* durante la degradación de células del intestino, ya que al interferir la expresión de

proteínas autofágicas como Atg2 y Atg18, se mantienen las estructuras intestinales que son degradadas en el desarrollo normal de la “mosca de la fruta”; la sola inhibición de caspasas no afecta la muerte celular (Denton *et al.*, 2009).

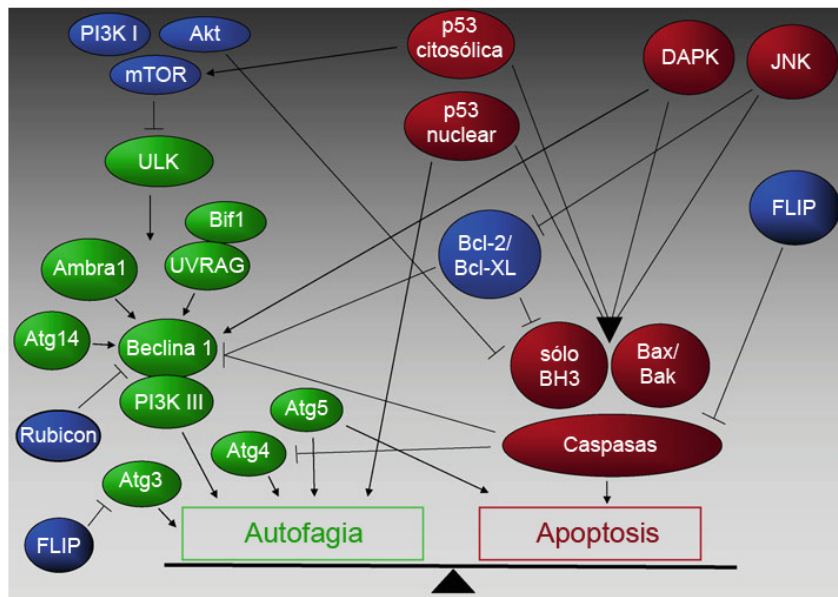


Figura 5. Relación molecular entre autofagia-apoptosis. En verde se indican proteínas necesarias para la autofagia, mientras que en rojo se indican las proteínas que participan en la apoptosis; en azul se indican proteínas inhibitorias para la autofagia o la apoptosis (Modificado de Fimia y Piacentini, 2010).

Los ejemplos en los que la apoptosis y la autofagia participan de forma cooperativa son más numerosos. En la degradación de las glándulas salivales, durante el desarrollo de *Drosophila*, se requiere tanto de la apoptosis como de la autofagia, pues la inhibición de uno de los mecanismos lleva sólo a la degradación parcial de la estructura (Berry y Baehrecke, 2007). En la capa piramidal del hipocampo afectada a causa de isquemia, la autofagia tiene el papel predominante en la muerte de las neuronas de esa zona; sin embargo, posteriormente se activa la apoptosis y en ausencia de autofagia la apoptosis no se da correctamente (**Figura 6**) (Koike *et al.*, 2008). La muerte de neuronas simpáticas carentes de NGF, es otro ejemplo; en dichas neuronas se induce la autofagia desde que se elimina el factor de crecimiento y se mantiene en etapas tardías, aún cuando se induce la apoptosis (Xue *et al.*, 1999).

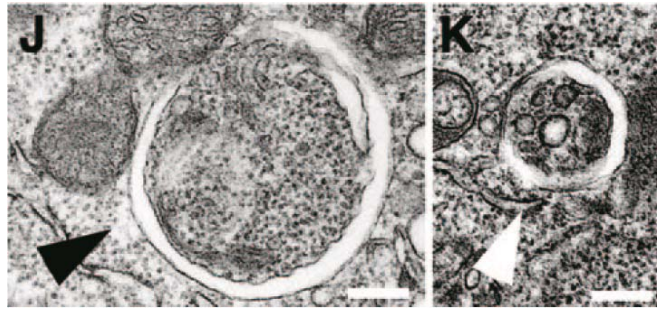


Figura 6. Autofagosomas nacientes en el hipocampo de ratones neonatos afectados por isquemia (Tomado de Koike *et al.*, 2008).

En diferentes patologías se ven afectados genes importantes para la apoptosis, lo que inhibe este tipo de muerte y evita que las células afectadas sean eliminadas; la autofagia podría representar una alternativa cuando la apoptosis está inhibida. Macrófagos activados con LPS, cuya apoptosis es inhibida por zVAD.fmk, presentan morfología autofágica, GFP-LC3 cambia de un patrón difuso a un patrón punteado y el receptor nuclear Nur77 media la muerte de los macrófagos (Kim *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2006). También, células derivadas de glioma que mueren por exposición a selenio y derivados, presentan incremento en el patrón punteado de la fusión GFP-LC3 (Kim *et al.*, 2007). En el caso de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, en inglés) *Bax^{-/-}/Bak^{-/-}* resistentes a la inducción de la apoptosis, el tratamiento con etoposide, estaurosporina o taspigargina induce una muerte celular con morfología vesicular, que requiere de genes necesarios para la autofagia como son Atg5 y Beclina-1 (Shimizu *et al.*, 2004). Ejemplos como estos llevaron al análisis de compuestos químicos que estimularan la inducción de muerte celular con características autofágicas en células cancerosas, de esta manera se encontró la molécula "autophagonizer", la cual en diferentes células transformadas de humano induce una muerte independiente de caspasas y con morfología autofágica (Choi *et al.*, 2010).

Adicionalmente, cabe señalar que la autofagia no es un mecanismo exclusivo de animales, en las plantas también participa en la degradación de estructuras que dejan de ser requeridas durante el desarrollo, ayuda a contender el estrés ambiental y su principal asociación con la muerte se debe a su activación en la respuesta hipersensible (revisado en Miura y Hasegawa, 2010).

C. El receptor nuclear Nur77

La subfamilia NR4A, perteneciente a la superfamilia de receptores para hormonas esteroideas/tiroideas, está conformada por Nur77, Nurr1 y Nor-1. Esta subfamilia conserva la estructura típica de los receptores clásicos; es decir, un dominio de transactivación en el extremo amino terminal, un dominio de unión a ADN (DBD, en inglés) en la región central de la proteína y un dominio de unión a ligando (LBD, en inglés) en su extremo carboxilo terminal (**Figura 7**). Los receptores NR4A tiene la particularidad de no requerir aparentemente la unión de un ligando para su activación o posiblemente este ligando no se ha reconocido, lo que los define como receptores nucleares huérfanos (revisado en Giguere, 1999, Winoto y Littman, 2002).

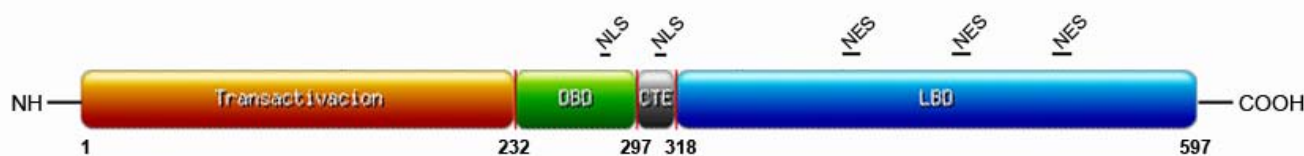


Figura 7. Esquema de los principales dominios que conforman a Nur77. Los números inferiores indican los residuos que forman parte de ese dominio, en la parte superior se indican los sitios donde se encuentran las señales de localización nuclear (NLS) y las señales de exportación nuclear (NES). CTE, indica la región constante que funciona como bisagra para la unión de las regiones NH₂ y COOH.

Para llevar a cabo su actividad transcripcional, la subfamilia de Nur77 requiere básicamente de tres dominios o secuencias: 1) los dedos de zinc presentes en su DBD, para interactuar con el ADN y unirse a la secuencia responsiva NBRE (AAAGGTCA) como monómeros o a la secuencia NurRE (TGATATTTX₆AAATGCCA) como homo- u heterodímeros; 2) señales de localización nuclear (NLS, en inglés) para su mantenimiento dentro del núcleo; y 3) dominios moduladores o factores de activación (AF, en inglés), a los que generalmente se asocian cofactores para regular la actividad del receptor en cuestión (revisado en Giguere, 1999, Hsu *et al.*, 2004, Winoto y Littman, 2002).

Los tres miembros de la subfamilia de Nur77 están implicados en procesos comunes como la regulación del metabolismo en la adipogénesis, el apetito, la glucosa (Zhan *et al.*, 2008) y la regulación del sistema inmune, incluso existe cierto grado de compensación entre los miembros; sin embargo, también pueden tener funciones específicas. En la arterioesclerosis humana, se expresan los tres miembros en macrófagos, pero Nor-1 está relacionado con la proliferación de las células del músculo liso, mientras que Nur77 podría inhibir la proliferación y participar en la diferenciación de dichas células (Bonta *et al.*, 2007). Por otro lado, Nurr1 de manera independiente a Nur77 y Nor-1, participa en la generación de neuronas dopaminérgicas, cuya disminución en la sustancia *nigra pars compacta* tiene implicaciones en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson; también

favorece la sobrevivencia de células transformadas como HeLa y HCT116 (revisado en Flaig *et al.*, 2005, Ke *et al.*, 2004, Masuyama *et al.*, 2001, Pearen y Muscat, 2010).

1. Nur77 en muerte y sobrevivencia celular.

Los estudios de la participación de Nur77 en la selección del sistema inmune son extensos. En células T, la expresión de Nur77 es constitutiva e incrementa durante la selección negativa; además, durante la estimulación con TCR, regula la transcripción de genes pro-apoptóticos como FasL, TRAIL, NDG1 y NDG2 (Fujii *et al.*, 2008, Rajpal *et al.*, 2003, Sohn *et al.*, 2007).

Aunque en el caso de las células T se requiere de la actividad transcripcional de Nur77 para la inducción de la apoptosis, hay ejemplos en los que su actividad pro-apoptótica es independiente de su actividad transcripcional, como en presencia de agentes apoptóticos como taspigargina, estaurosporina o etoposide que inducen la sobreexpresión de Nur77 y una fracción se exporta al citoplasma para su translocación a la mitocondria, donde induce la liberación del citocromo c y causa la activación de la apoptosis, sin requerirse su actividad transcripcional, ya que la ausencia del DBD no afecta la muerte celular (Li *et al.*, 2000). El papel apoptótico de Nur77 en diferentes líneas celulares tratadas con AHPN y su análogo, 3-Cl-AHCP, también es independiente de su actividad transcripcional, al haber sobreexpresión y translocación de Nur77 al citoplasma, donde se dirige a la mitocondria y retículo endoplásmico, lo que se ha asociado con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y estrés a retículo endoplásmico, así como la activación de las caspasas -4, -8 y -9 (Kolluri *et al.*, 2003, Liang *et al.*, 2007). Su translocación al citoplasma también correlaciona con la disminución de tumores gástrico y de colon (Zhan *et al.*, 2008). De hecho, la disminución de Nur77 está asociada con la metástasis en tumores sólidos de mama y próstata (revisado en Moll *et al.*, 2006). En macrófagos activados con LPS y tratados con zVAD, la expresión de una mutante dominante negativa de Nur77, que carece del DBD, no afecta la muerte, lo que sugiere que puede ser independiente de la actividad transcripcional de Nur77 y Nur77 podría translocarse a la mitocondria (Kim *et al.*, 2003).

De manera antagónica, existen reportes de la participación de Nur77 en sobrevivencia y/o proliferación. De hecho, inicialmente Nur77 fue descrito como un gen de respuesta temprana a factores de crecimiento presentes en el suero (Hazel *et al.*, 1988). Las células nulas en TNFR1 o NF- κ B no expresan Nur77 y son más sensibles a la muerte por TNF, lo que está asociado con la reducción en la activación de caspasa-8 y -3, mientras que la expresión exógena de Nur77 las protege; además, la localización de Nur77 es mayoritariamente nuclear, lo que sugiere que su papel protector es mediado por su actividad transcripcional (Suzuki *et al.*, 2003).

En presencia de VEGF, Nur77 está asociada con la formación de vasos sanguíneos y por consiguiente en la angiogénesis tanto de células HUEVC *in vitro* como en ratones *in vivo*, aparentemente mediante la participación de su dominio de transactivación y de unión a ADN, lo que apunta a su actividad transcripcional

(Zeng *et al.*, 2006). En células HeLa revertidas de transformadas a no transformadas (HeLa HF) se detectó la disminución de la expresión de la subfamilia de Nur77 lo que sugirió un efecto oncogénico, principalmente para Nurr1 y Nur77 (Ke *et al.*, 2004).

Existen revisiones que han encasillado la actividad transcripcional de Nur77 como pro-sobrevivencia y su participación en la apoptosis independiente de dicha actividad y más bien asociada a su localización citoplásmica; sin embargo, como se ejemplificó anteriormente, esto es contexto dependiente, influyendo la línea celular y los estímulos bajo los cuales se hizo el estudio.

D. Sumoilación

La ubiquitinación es una modificación postraduccional cuyo mecanismo de conjugación es multipasos, el efecto dependerá de la lisina a la que se conjugue y el número de moléculas de ubiquitina adicionadas, (monómeros o multímeros), aunque la actividad mejor conocida de la ubiquitinación es su participación en la degradación de proteínas de vida media corta y mediana. Se han descrito varios péptidos similares a ubiquitina que conservan similitud estructural y/o en el mecanismo de conjugación, como es el caso de SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), el cual tiene una identidad del 18% con ubiquitina y conserva el mecanismo de conjugación, sin asociación directa con la degradación de proteínas (revisado en Dye y Schulman, 2007, Martin *et al.*, 2007).

En los eucariontes, SUMO es un péptido conservado, que ha sido identificado en levaduras, plantas y mamíferos. En los mamíferos se expresan parálogos de SUMO (SUMO-1, -2, -3 y -4), de los cuales el más estudiado es SUMO-1. SUMO-2 y -3 son muy similares entre sí, de hecho sólo difieren en tres nucleótidos (**Figura 8**) (revisado en Miura y Hasegawa, 2010, Wilkinson y Henley, 2010). La proteína predicha para SUMO-4 sería más similar a SUMO-2, aunque la expresión de su ARNm está restringida al riñón y se sugiere podría tratarse de un pseudogene (Bohren *et al.*, 2004, Owerbach *et al.*, 2005).



Figura 8. Comparación de las secuencia de aminoácidos de las diferentes isoformas de SUMO y ubiquitina. Los residuos conservados en los cuatro péptidos se muestran en rojo, los residuos verdes muestran cambios conservativos y los aminoácidos en azul son aquellos que están conservados sólo entre los parálogos de SUMO y no se conservan con ubiquitina (Tomado de Martin *et al.*, 2007)

La sumoilación es una modificación postraduccional en la que SUMO se conjuga a una proteína diana, pero debido a que este péptido se sintetiza como precursor, requiere ser madurado para dejar expuesto un par de glicinas C-terminales, con las cuales SUMO se unirá a una lisina blanco mediante un enlace isopeptídico. La secuencia y número de aminoácidos que deben ser eliminados para la maduración difieren entre los distintos

SUMOs, lo que permite a las proteasas encargadas de procesarlos diferenciar a los precursores (revisado en Mikolajczyk *et al.*, 2007, Wilkinson y Henley, 2010).

Similar a la ubiquitinación, la sumoilación requiere de tres enzimas para su conjugación: la enzima E1 o activadora, la enzima E2 o conjugadora y la enzima E3 o ligasa (**Figura 9**). La enzima activadora en mamíferos está compuesta por el heterodímero SAE1-SAE2 y activa a SUMO en presencia de ATP, durante la reacción se forma un enlace tioéster de alta energía entre la E1 y SUMO, como resultado se libera AMP (**Figura 9**). Aunque SAE2 es la subunidad catalítica, se requiere de ambas subunidades para la activación tanto *in vitro* como *in vivo*. (revisado en Hay, 2005, Kerscher *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2002, Muller *et al.*, 2001, Wilkinson y Henley, 2010).

Una vez activado, SUMO es transferido a una cisteína en el sitio catalítico de la E2 (**Figura 9**). Hasta el momento se ha descrito una sola enzima conjugadora específica para SUMO, Ubc9. Debido a que tanto la ubiquitina como Ubc9 tienen carga positiva en su superficie, no pueden interactuar, mientras que SUMO posee carga negativa que permite sea conjugada por Ubc9 (revisado en Kerscher, 2007, Kerscher *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2002, Muller *et al.*, 2001, Wilkinson y Henley, 2010).

Las proteínas blanco de sumoilación tienden a presentar el motivo consenso ψ [I/V/L]KxE/D, donde ψ es cualquier aminoácido hidrofóbico, aunque preferentemente se han identificado residuos de isoleucina, valina o leucina; la lisina es el residuo con el que SUMO forma el enlace isopeptídico; X hace referencia a cualquier aminoácido y finalmente se ha identificado un ácido glutámico o aspártico. Ubc9 permite que SUMO entre en contacto con el motivo consenso del sustrato a sumoilar y se conjugue covalentemente. La presencia de esta secuencia puede ser un indicio de sumoilación pero no necesariamente un sinónimo, ya que lisinas blanco que no forman parte de secuencias consenso son modificadas o secuencias consenso que no lo son, incluso se han descrito interacciones no covalentes (revisado en Kerscher *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2002, Martin *et al.*, 2007, Verger *et al.*, 2003).

Los estudios iniciales de sumoilación *in vitro* sugirieron la dispensabilidad de enzimas ligasas, ya que altas concentraciones de SAE1-SAE2 y Ubc9 parecían ser suficientes para conjugar SUMO a su molécula blanco (Okuma *et al.*, 1999); sin embargo, la presencia de E3 ligasas fortalece la interacción para que se dé el enlace isopeptídico entre SUMO y la proteína blanco. Se han descrito por lo menos dos enzimas E3 ligasas para SUMO en levadura (Siz1 y Siz2); mientras que en mamíferos se ha identificado a RanBP2, Pc2 y varios miembros de la familia PIAS (**Figura 9**), estas últimas son las más ampliamente descritas, cuyo dominio SP-RING está relacionado al dominio RING de las E3 de ubiquitina (revisado en Dye y Schulman, 2007, Miura y Hasegawa, 2010, Pichler *et al.*, 2002, Schmidt y Muller, 2003).

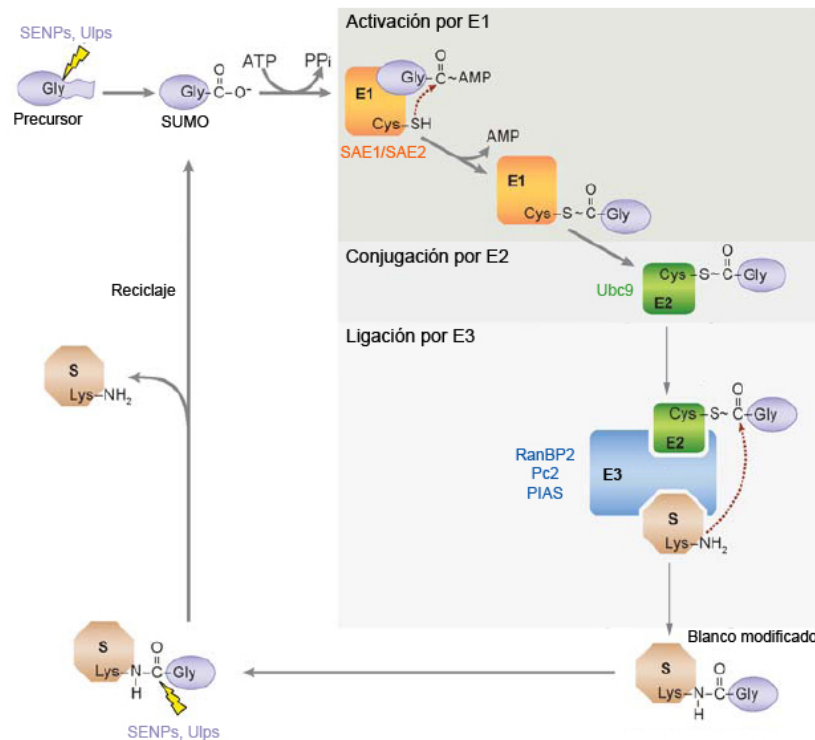


Figura 9. Proceso de conjugación general para Ubl. Los nombres indicados junto a los recuadros que caricaturizan a las enzimas son específicos para SUMO, mientras que el proceso en general de conjugación se conserva en moléculas similares a ubiquitina. (Modificada de Kerscher *et al.*, 2006)

Al igual que la ubiquitina, SUMO-2 y -3 pueden formar multímeros para el ensamblaje de cadenas *in vitro* e *in vivo*, para lo que se requiere de una secuencia consenso para sumoilación interna en los péptidos de la que forman parte las Lys15 y Lys11, respectivamente (Tatham *et al.*, 2001). SUMO-1 no presenta el sitio consenso interno, aunque *in vitro* puede darse en las Lys17 y Lys18 (revisado en Mukhopadhyay y Dasso, 2007).

La sumoilación es un proceso reversible, ya que el sustrato al que se ha conjugado SUMO es susceptible de desumoiarse y el péptido puede reciclarse. La familia SENP de proteasas específicas para SUMO (Ulps en *Saccharomyces cerevisiae*), diverge funcionalmente en dos grupos: aquel con actividad de endopeptidasa, importante para la maduración del péptido (SENP1, SENP2, SENP3 y SENP5; Ulp1 en *S. cerevisiae*) y el grupo con actividad de isopeptidasa, que pudiera ser más importante para la desumoilación y sobre todo en el desmantelamiento de las cadenas de poliSUMO-2/-3 (SENP6 y SENP7; Ulp2 en *S. cerevisiae*) (**Figura 9**) (revisado en Hay, 2005, Hay, 2007, Mikolajczyk *et al.*, 2007, Muller *et al.*, 2001). De manera particular, el péptido hipotético para SUMO-4 presentaría un residuo de prolina en la posición 90 que evitaría la interacción de las proteasas para su maduración y su desconjugación (Owerbach *et al.*, 2005). No todas las proteasas SENP son específicas para SUMO, SENP8 es específica para Nedd8, otro péptido similar a ubiquitina (Mikolajczyk *et al.*, 2007, revisado en Mukhopadhyay y Dasso, 2007).

Las modificaciones postraduccionales pueden ser mutuamente excluyentes o cooperativas. Se ha propuesto una sinergia entre la fosforilación y la sumoilación, ya que la fosforilación de una serina (Ser) o treonina (Thr), introduce una carga negativa al centro hidrofóbico del motivo consenso, lo que favorecería la interacción de SUMO con la lisina del sustrato, de carga positiva. De hecho, en algunos casos donde no hay un residuo fosforilado cerca, 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 ψ KxExxS/T, como secuencia para la relación fosfo-sumoil (revisado en Yang y Gregoire, 2006). Por ejemplo, en el caso de HSF1 (factor de choque calórico 1, por sus siglas en inglés) la fosforilación en la Ser303, es seguida de la sumoilación en la Lys298, y la sumoilación de MEF2 (factor potenciador miocítico 2, por sus siglas en inglés, que regula la expresión de Nur77) es posterior a la fosforilación por Cdk5; en ambos ejemplos se ha observado la necesidad de una fosforilación previa a la conjugación de SUMO (revisado en Beg y Scheiffele, 2006, Hietakangas *et al.*, 2003, Kerscher, 2007, Yang y Gregoire, 2006).

1. Implicaciones de la sumoilación.

La conjugación de SUMO a su molécula blanco puede tener de manera general tres consecuencias: 1) proveer un sitio nuevo de unión que favorezca interacciones entre proteínas, 2) bloquear motivos y por lo tanto interacciones o 3) ocasionar cambios conformacionales. Los efectos específicos dependerán de la naturaleza de la proteína modificada, entre los que se han descrito: cambios en la localización celular, la formación de estructuras subnucleares, la modulación de la actividad transcripcional e inicialmente se propuso la estabilización de proteínas, entre otros (revisado en Kim *et al.*, 2002, Meulmeester y Melchior, 2008, Wilkinson y Henley, 2010).

El primer sustrato identificado para SUMO fue la proteína citoplásmica RanGAP1 y se observó que al ser sumoilada es dirigida a la periferia del núcleo donde interactúa con RanBP2, una proteína del complejo del poro nuclear. La sumoilación estabiliza la interacción con RanGAP1-RanBP2, posiblemente mediando algún cambio estructural (revisado en Kim *et al.*, 2002, Mahajan *et al.*, 1997, Muller *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, por sus siglas en inglés) identificados como sitios de reclutamiento por la asociación transitoria de moléculas como CBP, Sp100, Daxx, Rb, p53 y BLM, que también son susceptibles de sumoilación (revisado en Kamitani *et al.*, 1998, Kerscher *et al.*, 2006, Muller *et al.*, 2001, Shen *et al.*, 2006, Zhong *et al.*, 2000)

El reclutamiento de factores de transcripción en 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 y en algunos casos a la inducción, aunque hay claras

excepciones. Sam68 es una proteína represora que inhibe la transcripción de la ciclina D1 al unirse al ARN y al estar sumoílada potencia la represión (Babic *et al.*, 2006). También la actividad transcripcional de c-Jun y el receptor del ácido retinóico es regulada negativamente por SUMO (revisado en Kim *et al.*, 2002, Muller *et al.*, 2001). p53 aparentemente es la excepción a la regla, ya que su reclutamiento en PML NBs se relaciona con un incremento en su actividad transcripcional y a su vez esto ocasiona un incremento en su actividad apoptótica (Fogal *et al.*, 2000), también la interacción de ER α con enzimas de sumoílación estimula su actividad transcripcional (revisado en Faus y Haendler, 2006).

El papel antagónico que inicialmente se describió entre SUMO y ubiquitina se debe a la competencia de estos péptidos por el mismo residuo de lisina en algunos blancos, por lo que se asoció a la sumoílación con la estabilización de proteínas. El caso más conocido es el del inhibidor de NF- κ B. I κ B α puede ser ubiquitinado o sumoílado en la Lys21, la sumoílación lo estabiliza y disminuye la actividad transcripcional de NF- κ B (Desterro *et al.*, 1998); en cambio, en presencia de TNF α se fosforila, señal necesaria para que sea reconocido por la maquinaria de ubiquitinación y consecuentemente es degradado. A su vez, el caso de I κ B α muestra como la sumoílación regula negativamente la actividad transcripcional de una proteína (revisado en Kim *et al.*, 2002, Muller *et al.*, 2001). En *Drosophila* la ubiquitinación de la Huntingtina, proteína cuya mutación causa la enfermedad de Huntington, correlaciona con la disminución de la neurodegeneración, mientras que la sumoílación exagera los síntomas de la enfermedad (Steffan *et al.*, 2004).

Recientemente se observó cooperatividad entre la sumoílación y la ubiquitinación, ya que la sumoílación podría ser una señal para el reclutamiento de la maquinaria de ubiquitinación o podría potenciarla; incluso se ha propuesto a la sumoílación como una especie de E3 ligasa para ubiquitina. En el caso de parkina, la sumoílación incrementa la ligación de ubiquitina. TOPORS funciona como E3 para ubiquitina y para SUMO; además, se han descrito enzimas denominadas STUbL (SUMO-targeted Ub ligase) con un sitio de unión a SUMO amino terminal y un RING-finger en el carboxilo terminal. Lo anterior refleja la compleja relación entre la sumoílación y la ubiquitinación (revisado en Denuc y Marfany, 2010, Wilkinson y Henley, 2010).

Los elementos para la sumoílación son esenciales en *S. cerevisiae*, ya que las mutaciones de *SMT3* (homólogo a SUMO), *UBA2* (homólogo de SAE1), *AOS1* (homólogo de SAE2), *UBCA9* y *ULP1* (homólogo de SENP), ocasionan defectos en la progresión del ciclo celular; además, la mutante en *ULP2* (homólogo de SENP) sufre hipersensibilidad a daño a ADN y segregación incorrecta de cromosomas (revisado en Kim *et al.*, 2002).

La sumoílación se regula por diferentes estímulos, Por ejemplo, durante la hipoxia incrementa la sumoílación por SUMO-2/-3 de HIF, regulador transcripcional durante la hipoxia. En cuanto al metabolismo, los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 son blancos de sumoílación (revisado en Agbor y Taylor, 2008).

2. Formas de inhibir la sumoilación

Usualmente para analizar la importancia de la sumoilación dentro de un proceso biológico se inhibe su conjugación de manera general o específica.

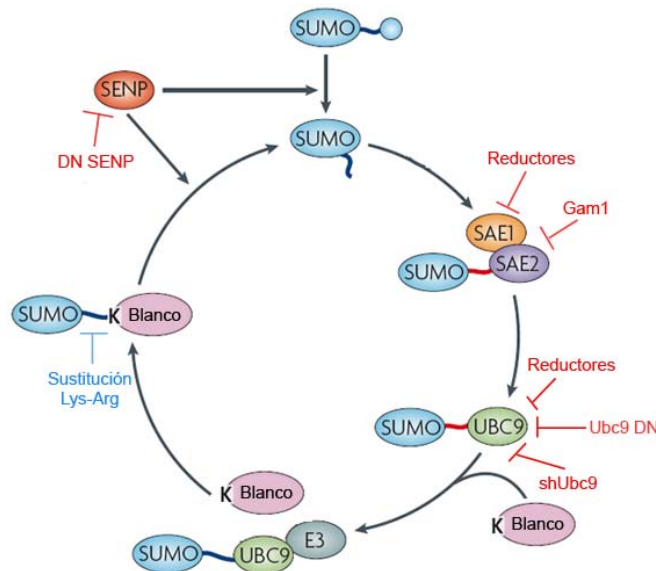


Figura 10. Formas de inhibir la sumoilación. Los inhibidores marcados en rojo hacen referencia a inhibidores generales, mientras que en azul está señalado un ejemplo de inhibición específica (Modificado de Martin *et al.*, 2007).

Inhibición de la sumoilación general: El mecanismo multipasos de conjugación de SUMO permite más puntos de regulación, por lo que la interferencia con alguno de ellos ocasiona la inhibición general de la sumoilación.

Agentes reductores: como DTT (ditiotreitól) o β -mercaptoetanol, ocasionan la ruptura o inhibición de enlaces tioéster al reducir el grupo tiol, evitando la interacción entre SUMO y la Cys de SAE2 (E1), y/o la interacción de la Cys en la E2 con SUMO (Kerscher *et al.*, 2006) (Figura 10). Los agentes reductores también pueden afectar los puentes disulfuro en proteínas no relacionadas con el proceso de sumoilación.

Mutantes dominantes negativas de las proteasas SENP (DN SENP): *in vitro*, se ha reportado predominancia de la actividad endopeptidasa sobre la isopeptidasa para SENP1 (Mikolajczyk *et al.*, 2007). La Cys630 de SENP1 es importante para su actividad catalítica y está altamente conservada. Así, su modificación por un residuo de serina ocasiona el efecto de mutante dominante negativa (Figura 10) y la consecuencia de su expresión es la acumulación de conjugados a SUMO-1 de peso molecular elevado (Bailey y O'Hare, 2004).

El ratón homólogo para la mutación de SuPr-2, el gen ortólogo de la proteasa SENP1, tiene morfología y patrones de desarrollo aparentemente normales, cuyo fenotipo presenta acumulación de sangre en el tronco debido a la falla de flujo sanguíneo con la placenta, observado desde los E12.5 días. A nivel celular, MEFs

aislados del mutante así como células extraídas de la placenta, indican un incremento en la detección de conjugados de SUMO-1 de peso molecular alto (Yamaguchi *et al.*, 2005), consistente con el reporte de Bailey y O'Hare (2004), y una disminución de la cantidad de SUMO-1 libre; lo que indica la inhibición de la actividad isopeptidasa. Sin embargo, también observan un incremento en el precursor de SUMO, es decir, en la forma no madura, lo que indica también la inhibición de la actividad de endopeptidasa (Yamaguchi *et al.*, 2005).

La acumulación del precursor de SUMO al interferir a la familia de proteasas SENP, proporciona la posibilidad para inhibir la sumoilación de proteínas en general, pero debido al papel dual de la familia como iso- y endopeptidasas, los resultados obtenidos pueden ser difíciles de interpretar.

Gam1: es una proteína viral que se expresa temprano durante la infección del adenovirus aviar CELO y puede interferir con la sumoilación *de novo*. Gam1 interactúa con SAE1 (**Figura 10**) y favorece su degradación mediante el reclutamiento de un complejo de ubiquitinación. La presencia de ambas subunidades, SAE1/SAE2, es necesaria para la estabilización del heterodímero, pues la disminución de SAE1 lleva a la degradación de SAE2 y por lo tanto no se pueden activar las moléculas de SUMO aún en presencia de ATP (Boggio *et al.*, 2007). El mecanismo cómo disminuyen los niveles de Ubc9 en presencia de Gam1 no es claro, pero correlaciona con el decremento de E1 (Boggio *et al.*, 2004, Boggio *et al.*, 2007).

Inhibición de Ubc9: existen varias publicaciones en las que se ha bloqueado la actividad de Ubc9, mediante el empleo de ARN interferente (RNAi, en inglés) para evitar su traducción, ya sea por transfección de siRNAs (small interfering RNA) o shRNA (short hairpin RNA) (**Figura 10**) (Tago *et al.*, 2005).

Por otro lado, la generación de la mutante Cys93Ser de Ubc9, genera una proteína dominante negativa con lo que se inhibe la conjugación de SUMO (**Figura 10**), ya que la sustitución de la cisteína 93 impide la formación del enlace tioéster entre la enzima E2 y SUMO (Poukka *et al.*, 1999, Schwarz *et al.*, 1998, Yokota *et al.*, 2007).

Inhibición de la sumoilación específica:

Mutaciones puntuales: la mutagénesis sitio-dirigida de las posibles lisinas blanco de sumoilación en la proteína diana es una alternativa para la inhibición de la sumoilación de manera más específica. Generalmente la mutación consiste en la sustitución del residuo de lisina por un residuo de arginina (**Figura 10**) (Babic *et al.*, 2006, Bohren *et al.*, 2004), para simular la carga positiva de la lisina pero con las respectivas diferencias estructurales.

VI. ANTECEDENTES:

A. Muerte celular programada no apoptótica inducida por SP/NK₁R.

En las neuronas se ha identificado una vía capaz de inducir la muerte con características autofágicas, activada por el receptor de neurokinina-1 (NK₁R) cuando se une su ligando, el neurotransmisor sustancia P (SP). La interacción SP/NK₁R activa una forma de muerte celular programada (MCP), tanto en neuronas como en células no neuronales (HEK293T), diferente a la apoptosis porque no se observa burbujeo de la membrana citoplásmica, fragmentación nuclear (son TUNEL negativas), ni la translocación de fosfatidilserina (Anexina-V negativas) a la región externa de la membrana citoplásmica; además, es independiente de caspasas pues no se evita en presencia de inhibidores de caspasas (z-VAD.fmk y BAF). En cambio, presenta vacuolación citoplásmica (Castro-Obregón *et al.*, 2002) y características autofágicas como el aumento de autofagosomas y procesamiento de LC3.

NK₁R es un receptor acoplado a proteínas G, de manera que al unirse a la SP, puede activar diversos sistemas de segundos mensajeros como: la movilización de Ca²⁺ intra- y extracelular, la movilización de ácido araquidónico o puede incrementar los niveles de AMPc (revisado en Quartara y Maggi, 1997). Sin embargo, la vía de muerte en la que están involucrados SP/NK₁R es independiente de los segundos mensajeros mencionados (Castro-Obregón *et al.*, 2004); más bien, activa una cascada de señalización mediada por las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en la que NK₁R interactúa con la molécula acopladora Arrestina 2, quien forma un complejo con Raf-1, ésta fosforila a MEK2 quien a su vez activa mediante fosforilación a ERK2. Al comparar el transcriptoma de células en proceso de muerte, inducida por SP/NK₁R, con el transcriptoma de células vivas, mediante hibridaciones de microarreglos, se identificó la sobreexpresión de Nur77 (Castro-Obregón *et al.*, 2004), ya descrito en modelos de muerte apoptótica y fosforilado específicamente por ERK2 (Slagsvold *et al.*, 2002). Se corroboró la participación de Nur77 en la muerte con características autofágicas a través de la expresión de mutantes dominantes negativas y por siRNA para Nur77, lo que causó una disminución de la muerte celular (Castro-Obregón *et al.*, 2004). (Figura 11).

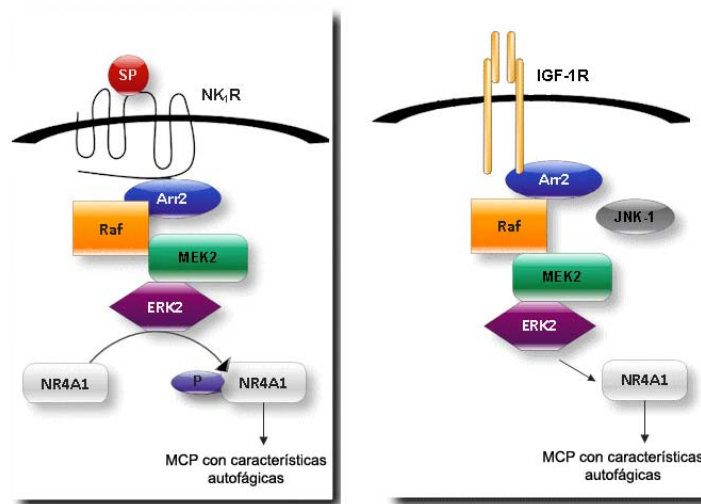


Figura 11. Modelos de muerte celular programada con características autofágicas, inducida a través de la señalización SP/NK₁R e IGF1R (Castro-Obregon *et al.*, 2004, Sperandio *et al.*, 2004). Detalles en el texto.

B. Muerte celular programada inducida por IGF1R.

El receptor del factor de crecimiento tipo insulina-1, IGF1R (insuline growth factor-like 1 receptor, en inglés), participa en la supervivencia, proliferación y diferenciación (revisado en Baserga, 2000, Hongo *et al.*, 1998); sin embargo, Sperandio *et al.*, (2000) observaron que cuando es sobreexpresado deja de inducir señales de supervivencia, dando lugar a un tipo de muerte celular programada con morfología diferente a la apoptosis, la cual denominaron paraptosis.

La paraptosis inducida por IGF1R requiere la transcripción y la traducción *de novo*; sin embargo, no presenta las características morfológicas ni marcadores propios de la apoptosis: no hay fragmentación nuclear ni condensación de la cromatina, no hay efecto sobre la muerte en presencia de inhibidores de caspasas (zVAD.fmk, BAF, p35, XIAP, Bcl-XL) y tampoco se observa la formación de cuerpos apoptóticos, pero si la presencia de vesículas citoplásmicas. Debido a que no se observó el procesamiento de PARP clásico de necrosis (fragmentos de 50 a 62 KDa), se descartó que pudiera tratarse de muerte necrótica (Sperandio *et al.*, 2000, Sperandio *et al.*, 2004). La muerte por IGF1R requiere de la activación de las MAP cinasas ERK y JNK (Figura 11), donde MEK2 juega un papel preferente sobre MEK1, como se probó por farmacología y siRNAs específicos para dichas cinasas. (Sperandio *et al.*, 2004). Dadas las similitudes con la muerte provocada por SP/NK₁R podría tratarse del mismo mecanismo de muerte.

C. Muerte celular con características autofágicas mediada por Nur77.

La muerte celular programada inducida por SP/NK₁R o por IGF1R tienen en común la ausencia de marcadores clásicos de apoptosis y la formación de vesículas citoplásmicas, con posible naturaleza autofágica. Al analizar marcadores de autofagia para ambos modelos de muerte celular, se observó el incremento de LC3-II y el cambio de un patrón difuso a uno punteado de GFP-LC3, indicativo de su asociación con los autofagosomas; además, hubo disminución de la muerte al inhibir farmacológicamente o con siRNA a la PI3K-III, proteína central de la maquinaria autofágica (Bouzas-Rodríguez, 2006)

Debido a las similitudes que presentan ambos modelos de muerte, se investigó la participación de Nur77 en la muerte inducida por IGF1R y efectivamente, la expresión de proteínas mutantes dominantes negativas para Nur77 (Nur77 Δ N152 y Nur77 Δ DBD) disminuyó la muerte celular (Bouzas-Rodríguez, 2006). Por consiguiente, la muerte inducida por SP/NK₁R e IGF1R tiene características autofágicas y son mediadas por Nur77 (**Figura 11**). En este trabajo investigamos si la maquinaria de la autofagia es necesaria para la muerte celular en estos modelos.

D. Modificaciones postraduccionales de Nur77.

1. Fosforilación de Nur77.

Tabla 3. Algunas fosforilaciones de Nur77

Estímulo	Cinasa	Residuo	Efecto	Línea celular	Referencia
NGF		Ser316	Disminución de actividad transcripcional	PC12	Katagiri <i>et al.</i> , 1997
NGF	Vía TrkA/ Ras/MAPK	Ser105/Ser140	Exportación de NGFI-B al citoplasma	PC12	Katagiri <i>et al.</i> , 2000.
ACTH		N-term	Favorece actividad transcripcional al incrementar afinidad por ADN	Y1	Davis y Lau, 1994.
	Pp90rsk	Ser351	Disminuye afinidad por ADN	PC12	Swanson <i>et al.</i> , 1999
EGF	ERK2		Inhibe localización mitocondrial y evita muerte celular	CV-1	Jacob <i>et al.</i> , 2004
-	ERK2	Thr142	No especificado	<i>In vitro</i>	Slagsvold <i>et al.</i> , 2002.
-	JNK	N-term	Favorece exportación nuclear e interacción con Bcl-2.		Han <i>et al.</i> , 2006
-	Akt	Ser350/Ser351	Disminución de afinidad por ADN e interacciona con las proteínas 14-3-3	DO11.1 y Rat1a	Masuyama <i>et al.</i> , 2001.
Suero	Pp90rsk	Ser354	No especificado	HeLa y COS-1	Davis <i>et al.</i> , 1993

La actividad de Nur77 se regula por fosforilación y el efecto puede ser sobre su localización subcelular, su actividad transcripcional, su interacción con otras proteínas o su participación como molécula anti o pro-supervivencia, lo cual dependerá del dominio en el que se encuentre el residuo fosforilado (**Tabla 3**) (revisado en Hsu *et al.*, 2004, Masuyama *et al.*, 2001, Slagsvold *et al.*, 2002)

Las formas hiperfosforiladas son preferentemente citoplásmicas, mientras que las formas hipofosforiladas residen en el núcleo, como fue probado por Katagiri *et al.* (2000) y Han *et al.* (2006), al realizar fracciones celulares.

Evidentemente el efecto de la fosforilación también dependerá del dominio al que se conjugó el fosfato y el estímulo que indujo la modificación. Por ejemplo, en presencia de NGF, Nur77 se fosforila en la Ser105 y en la Ser316, con consecuencias distintas. La fosforilación de la Ser105 induce la exportación nuclear de Nur77, mientras que mutagénesis de la Ser316 no evita la exportación nuclear, pero sí afecta la actividad transcripcional de NGFI-B (ortólogo de Nur77 en ratón) (Katagiri *et al.*, 1997, Katagiri *et al.*, 2000). En la **Tabla 3** se resumen diferentes casos en los que Nur77 se regula por fosforilación

2. Sumoilación de Nur77.

El comportamiento de Nur77 durante la muerte autofágica sugiere su regulación por sumoilación, pues la proteína es estabilizada, fosforilada y se transloca del núcleo al citoplasma. La sumoilación de Nur77 podría permitir la interacción de Nur77 con un grupo distinto de proteínas, respecto a cuando no está sumoilado. También podría afectar su actividad como factor de transcripción e incluso podría alterar su localización intracelular.

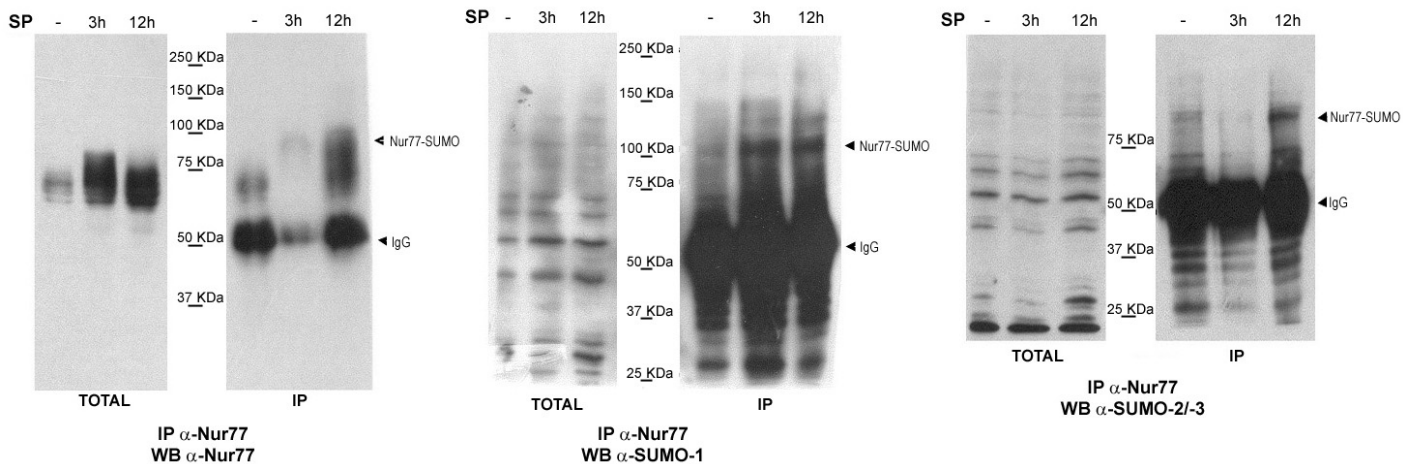


Figura 12. Sumoilación de Nur77. Inmunoprecipitación de Nur77 y detección con a) anti-Nur77, b), anti-SUMO-1 o c) anti-SUMO-2/-3. Los extractos empleados fueron obtenidos a partir de células previamente transfectadas con NK1R y estimuladas con SP, de acuerdo a los tiempos indicados (Zárraga, 2008).

De acuerdo con los resultados un análisis bioinformático que predijeron la existencia de dos motivos consenso de sumoilación que involucran los residuos Lys102 y Lys577 de la secuencia de Nur77, los cuales se encuentran conservados en los tres miembros de la familia NR4A, mostramos mediante ensayos de

inmunoprecipitación, la sumoilación de Nur77 por SUMO-1 y SUMO-2/-3 (Figura 12). Al analizar la sumoilación global de proteínas durante la muerte por SP/NK₁R, no se observó un patrón diferencial de sumoilación con respecto al control, lo que sugiere cambios en proteínas específicas (Figura 13) (Zárraga, 2008). Ya que los datos anteriores sugieren la sumoilación de proteínas particulares como Nur77, en el presente proyecto se estudió si la sumoilación tiene relevancia funcional durante la muerte y el papel sobre la actividad transcripcional de Nur77 de las lisinas predichas como sitio de sumoilación.

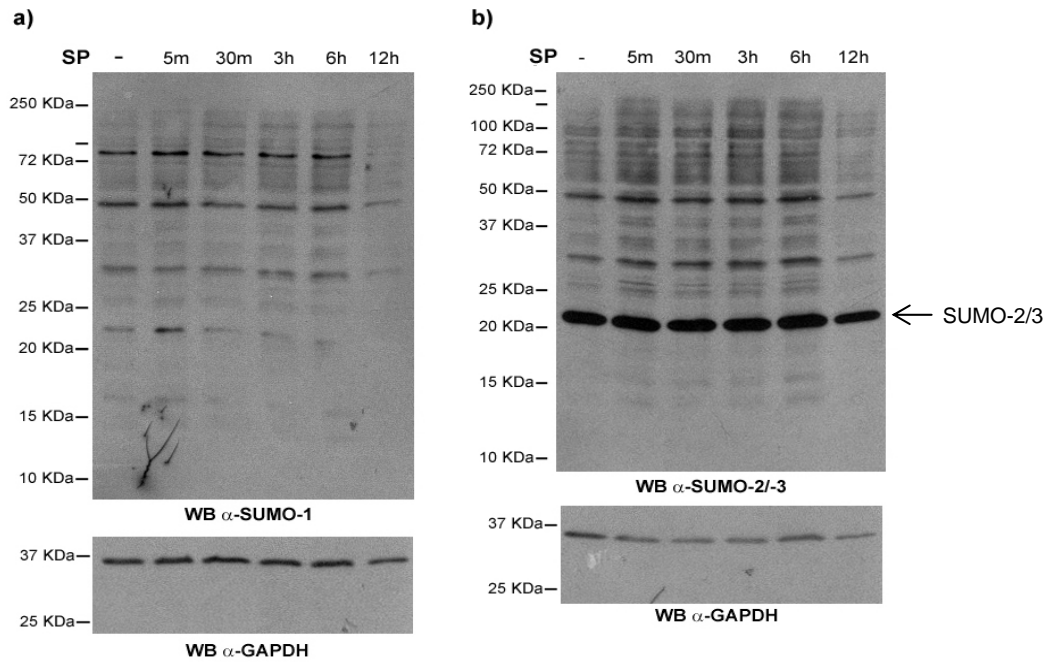


Figura 13. Curso temporal de inducción de la muerte no apoptótica. Detección por western blot de SUMO-1 a) o b) SUMO-2/-3. Los extractos empleados fueron obtenidos a partir de células previamente transfectadas con NK₁R y estimuladas con SP de acuerdo a los tiempos indicados (Zárraga, 2008).

VII. HIPÓTESIS:

Nur77 induce muerte celular dependiente de la maquinaria autofágica, al ser modificado postraduccionalmente.

VIII. OBJETIVOS GENERALES:

1. Determinar si la muerte celular mediada por Nur77 depende de proteínas de la maquinaria central de la autofagia.
2. Evaluar el papel de la sumoilación durante la muerte celular mediada por Nur77.
3. Generar proteínas mutantes puntuales de Nur77 en sitios predichos para la sumoilación o la fosforilación durante la muerte autofágica.
4. Evaluar la actividad transcripcional de las mutantes de Nur77 potencialmente no sumoilables o fosforilables.

IX. MÉTODOS

A. Biología Molecular

1. **Mutagénesis sitio-dirigida:** La mutación dirigida fue hecha a partir del Kit QuikChange site-directed mutagénesis (Stratagene # 200519), con el siguiente protocolo.

a) Ciclos de PCR:

1. Diseñar oligonucleótidos complementarios con la sustitución o inserción deseada flanqueada por la secuencia original aledaña al sitio modificado. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se muestran a continuación, las bases subrayadas indican las sustituciones o inserciones realizadas.

Ubc9-C93S:

5´- G TAC CCT TCG GGG ACA GTG AGC CTG TCC ATC TTA GAG G - 3´
5´- C CTC TAA GAT GGA CAG GCT CAC TGT CCC CGA AGG GTA C- 3´

FLAG-Nur77:

5´- C CCT CTA GAC GGC CGG ATG GAT TAT AAG GAT GAC GAT GAC AAG TGT ATG CCC TGT
ATC CAA GCC TGT -3´
5´- ACA GGC TTG GAT ACA GGG CAT CTT GTC ATC GTC ATC CTT ATA ATC CAT ACA CCG GCC
GTC TAG AGG G -3´

Nur77-K102R:

5´- CC CCT GCC TCT GCC TCC TTT AGA TTC GAG GAC TTC GAG GTG- 3´
5´- CAC CTC GAA GTC CTC GAA TCT AAA GGA GGC AGA GGC AGG GG -3´

Nur77-K558R:

5´- CA CGT CTG TTG GGC AGA CTG CCC GAG CTG CG -3´
5´- CG CAG CTC GGG CAG TCT GCC CAA CAG ACG TG -3´

Nur77-K577R:

5´- CAG CGC ATC TTC TAC TTG CGT CTG GAG GAC TTG GTG CCC- 3´
5´- GGG CAC CAA GTC CTC CAG ACG CAA GTA GAA GAT GCG CTG -3´

Nur77-T143A:

5´- CCG TCG CCC TCC GCA CCC AGC TTC CAG -3´
5´- CTG GAA GCT GGG TGC GGA GGG CGA CGG- 3´

Nur77-T143D:

5´- CCG TCG CCC TCC GAT CCC AGC TTC CAG- 3´
5´- CTG GAA GCT GGG ATC GGA GGG CGA CGG- 3´

2. Preparar las siguientes reacciones de PCR:

Tabla 4. Reacciones de PCR			
Reactivos	Control positivo de mutación	pcDNA3.1-Flag-Nur77	Control negativo de mutación
Buffer de reacción 10x	5 µl	5 µl	5 µl
Plásmido	10 µl (50 ng) pWhitescript	50 ng pcDNA3.1-Nur77	50 ng pcDNA3.1-Nur77
Primer #1	1.25 µl (125 ng) primer control #1	125 ng	125 ng
Primer #2	1.25 µl (125 ng) primer control #2	125 ng	125 ng
Mezcla de dNTPs	1 µl	1 µl	1 µl
Agua grado Biología Molecular	31.5 µl	Aforar a 50 µl	Aforar a 51 µl
Volumen total	50 µl	50 µl	51 µl
ADN polimerasa Pfu Turbo	1 µl	1 µl	-

3. Colocar las reacciones en el termociclador con los siguientes parámetros de ciclado:

Tabla 5. Parámetros de amplificación			
Ciclos	Temperatura	Tiempo para reacción control	Tiempo para pcDNA3.1-Flag-Nur77
1	95° C	1 minuto	1 minuto
18*	95° C	50 segundos	50 segundos
	55° C	1 minuto	1 minuto
	68° C**	5 minutos	8 minutos
1	68° C	7 minutos	7 minutos

*El número de ciclos está dado por el tipo de mutación que se desea, para inserción de aminoácidos múltiples se requieren 18 ciclos.

** A 68° C es la temperatura en que se da la amplificación del ADN, por lo que el tiempo depende de la longitud del plásmido, se requiere de 1 minuto por Kb de longitud del plásmido; así, pWhitescript es un plásmido de 4.5 Kb, por lo que requiere de 5 minutos para su amplificación, mientras que pcDNA3.1-Nur77 es un plásmido de 7.5 Kb, requiriendo 8 minutos para su amplificación.

4. Al terminar los ciclos de PCR, colocar las reacciones en hielo 2 minutos. Previo a la adición de la enzima DpnI, se sugiere tomar un par de microlitros del producto de PCR para verificar la integridad del templado.

b) Digestión de cadena parental por DpnI:

1. Agregar 1 µl de la enzima de restricción DpnI por producto de PCR, pipeteando un par de veces para mezclarla con la reacción.
2. Incubar a 37° C durante 2 horas.

c) Precipitación de ADN:

1. Aforar a 100 μl el volumen en el que está resuspendido el ADN.
2. Agregar 10 μl (el 10% de volumen) de acetato de sodio 3 M a pH 5.2.
3. Agregar 200 μl de etanol absoluto frío e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm a 4° C. Decantar cuidadosamente.
5. Lavar la pastilla con 500 μl de etanol al 70%, frío.
6. Agitar y centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm a 4° C.
7. Decantar cuidadosamente y secar a temperatura ambiente.
8. Resuspender el precipitado en 3-5 μl de agua grado Biología Molecular.

d) Transformación de bacterias supercompetentes:

1. Descongelar las bacterias ultracompetentes XL10-gold (Stratagene #200315) en hielo. Por cada producto de PCR, colocar 100 μl de bacterias ultracompetentes y agregar 4 μl de β -mercaptoetanol, en tubos preenfriados BD Falcon de 14 ml de polipropileno. Incubar 10 minutos en hielo.
2. Preparar las siguientes reacciones:

Tabla 6. Reacciones para transformación					
Reactivos	Control positivo de mutagénesis	pcDNA3.1-Flag-Nur77	Control negativo de mutagénesis	Control positivo de transformación	Control de integridad de templado
ADN	Volumen total del precipitado	Volumen total del precipitado	Volumen total del precipitado	0.1 ng de pUC18	Volumen total tomado
Bacterias ultracompetentes incubadas con β -mercaptoetanol					

3. Mezclar cuidadosamente e incubar en hielo 30 minutos.
4. Dar un pulso calórico por 30 segundos a 42° C e inmediatamente transferir los tubos a hielo, por 2 minutos.
5. Agregar 500 μl de medio NZY⁺ o medio de recuperación, precalentado a 37° C.
6. Incubar a 37° C por una hora en agitación a 300 rpm, para permitir la recuperación de las bacterias.
7. 30 minutos previos al plaqueo de las bacterias, agregar 100 μl de IPTG 10 mM y 100 μl de X-gal 2% al medio selectivo en el que se plaqueará el control positivo de la mutagénesis. Para una mejor dispersión tanto de X-gal como IPTG, plaquearlos con 200 μl de medio SOC.
8. Plaques las bacterias de acuerdo a las siguientes proporciones:

Tabla 7. Plaqueo de reacciones					
Reactivos	Control positivo de mutagénesis	Flag-TR3-pcDNA3.1	Control negativo de mutagénesis	Control positivo de transformación	Control de integridad de templado
Bacterias transformadas y recuperadas	Volumen total	Volumen total	Volumen total	5 μ l + 200 μ l de medio NZY+ suplementado	Volumen total

9. Incubar las placas por lo menos 16 horas a 37° C.

2. Western blot

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

1. Aspirar el medio de cultivo y agregar 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.
2. Despegar las células con raspador; una vez resuspendidas, se transfieren a un tubo e de 1.5 ml.
3. Centrifugar 5 minutos a 358 g (rotor F2402) a 4° C, para eliminar los restos de medio de cultivo.
4. Conservar la pastilla y resuspender nuevamente en 1 ml de PBS frío. Para la detección de proteínas fosforiladas agregar NaF 10mM y glicero-2-fosfato de sodio 25mM, final, al PBS. Centrifugar 5 minutos a 358 g a 4° C.
5. Conservar la pastilla y resuspender en 50 μ l de buffer de lisis e incubar 20 minutos en hielo.
6. Transcurridos los 20 minutos, sonicar con 3 pulsos de 20 segundos a amplitud 1 (Minisonix, sonicator, Ultrasonic processor; Modelo S3000) para fragmentar las estructuras celulares no lisadas por el buffer, sobre todo el ADN.
7. Centrifugar 10 minutos a 17,530 g (rotor F2402) a 4° C, recuperar el sobrenadante y cuantificar la cantidad de proteína (μ g/ μ l).

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

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

Tabla 8. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford							
Curva estándar				Análisis de muestras			
Solución de Bradford 1:4 (μl)	Agua (μl)	Buffer de lisis (μl)	BSA [1 μg/μl] (μl)	Muestras	Solución de Bradford 1:4 (μl)	Agua (μl)	Extracto de proteína (μl)
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

2. 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 los valores de la ecuación de la recta ($y = mx + b$; donde: x =proteína y y =absorbancia), para interpolar los valores de las muestras y determinar la concentración de proteína en los extractos.
3. Hacer alícuotas de 30 μg y almacenar a -70° C hasta su uso, para evitar degradación de la proteína.

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

1. Preparar geles desnaturantes de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 9. Proporciones para geles desnaturantes						
Reactivos	Gel separador*					Gel concentrador 5% (3 ml)
	8% (9 ml)	10% (9 ml)	12% (9 ml)	15% (9 ml)	16% (9 ml)	
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	-	-	-	-	-	750 μl
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.385 ml	2.385 ml	2.385 ml	2.385 ml	2.385 ml	-
Agua	4.051 ml	3.453 ml	2.853 ml	1.956 ml	1.657 ml	1.697 ml
SDS 10%	90 μl	90 μl	90 μl	90 μl	90 μl	30 μl
A/B 30%	2.393 ml	2.991 ml	3.591 ml	4.488 ml	4.787 ml	498 μl
APS 10%	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl	22.5 μl
TEMED	6 μl	6 μl	6 μl	6 μl	6 μl	1.5 μl

* En este trabajo, se utilizaron geles desnaturantes al 8% para detectar la presencia de Atg7 y Nur77, al 10% para Beclina-1, al 15% para SUMO-1, SUMO-2/-3 y Ubc9, y al 16% para LC3.

2. Preparar la mezcla para el gel separador de acuerdo a las proporciones indicadas y verter la mezcla en el cassette para geles de poliacrilamida. Agregar 500 μ l de alcohol isobutílico sobre el gel, para alinearlo, y dejar polimerizar alrededor de 30 minutos. Se sugiere dejar una muestra de la mezcla en un tubo de 50 ml (Corning # 430828), para comprobar la polimerización.
 3. Drenar el alcohol isobutílico y preparar la mezcla para el gel concentrador de acuerdo a las proporciones indicadas en la tabla anterior. Colocar el peine y verter la mezcla sobre el gel separador. Esperar aproximadamente 30 minutos a que polimerice, dejar una muestra de la mezcla para comprobar la polimerización.
 4. 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.
 5. Preparar las muestras y el marcador de peso molecular de proteínas, mezclándolas con buffer de carga desnaturizante para proteínas. Es recomendable cargar 30 μ g de proteína por carril, para una mejor detección.
 6. Ya preparadas las muestras, se incuban 3 minutos a 95° C. Cuando se desean analizar proteínas fosforiladas, es importante no exceder el tiempo de incubación, para evitar que se pierda la modificación. El marcador de peso molecular no se calienta.
 7. Llenar la cámara de electroforesis con buffer de corrida.
 8. Cargar las muestras y el marcador de proteínas (Page ruler, Fermentas # SM1811) en el gel. Los carriles libres de muestra deben ser cargados con buffer de carga para proteínas y todos los carriles deben tener el mismo volumen.
 9. Correr el gel a 100 V mientras el frente de corrida, indicado por el azul de bromofenol del buffer de carga, pasa por el gel concentrador y aumentar a 150 V hasta que el frente de corrida llegue al final del gel. Toma aproximadamente 2 horas.
- d) Transferencia de proteínas de gel de poliacrilamida a membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride):**
1. 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.
 2. Prehumedecer esponjas y papeles Wathman (Bio Rad # 1703932) en buffer de transferencia frío, a saturación; de la misma manera, equilibrar en buffer de transferencia frío el gel de proteínas, obtenido con los pasos anteriores, y la membrana activada. Para la eficiente transferencia de proteínas de peso molecular bajo, se recomienda eliminar el SDS del buffer de transferencia y equilibrar el gel por 20-30 min.
 3. Armar 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.
 4. 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 con buffer de transferencia y correr durante 90 minutos a 100 V a temperatura ambiente. Puede recurrirse a la transferencia durante toda la noche (8-10 horas) a 14 V en frío, cuando hay poca proteína. Se sugiere corroborar la transferencia de proteínas correcta, al teñir la membrana con rojo de Ponceau al 0.1% durante 5 minutos y enjuagarlo con agua.

e) Bloqueo de membrana de PVDF:

- 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, en ambos casos en agitación. Para la detección de proteínas fosforiladas agregar NaF 10mM y glicero-2-fosfato de sodio 25mM finales, a la solución de bloqueo.
- Lavar 3 veces por 5 minutos con TBST a temperatura ambiente y en agitación, antes de incubar con los anticuerpos. Para la detección de proteínas fosforiladas agregar NaF 10mM y glicero-2-fosfato de sodio 25mM finales al TBST y al resto de soluciones de lavado.

f) Incubación con anticuerpos:

- Hacer la dilución del anticuerpo primario en TBST o TBST/BSA 5%, 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. Si el anticuerpo lo indica, incubar toda la noche (12-14 hrs) a 4° C.
- Lavar 4 veces con volúmenes grandes de TBST para revelar por quimioluminiscencia o PBS/Tween 0.2% para revelar por fluorescencia, en agitación por 7 minutos cada vez, antes de incubar con el anticuerpo secundario. La solución PBS/Tween 0.2% reduce la autofluorescencia de la membrana al usar fluorescencia.

Tabla 10. Anticuerpos primarios usados en ensayos de western blot

Anticuerpo primario	Dilución	Marca	Número de catálogo	Región de reconocimiento	Anticuerpo secundario
Anti-Beclina 1	1:1000	Cell signaling	3738	Alrededor de la treonina 72	Anti-conejo
Anti-Atg7	1:1000	Cell signaling	2631	N-terminal	Anti-conejo
Anti-LC3	1:1000	Sigma	L7543	Residuos 2-15 de LC3B humana	Anti-conejo
Anti-Nur77 (M-210)	1:300	Santa Cruz Biotechnology	sc-5569	Residuos 59-269	Anti-conejo
Anti-SUMO-1	1:1000	Cell signaling	4930	Información no proporcionada	Anti-conejo
Anti-SUMO-2/-3	1:1000	Cell signaling	4971	N-terminal de SUMO-3	Anti-conejo
Anti-Ubc9	1:250	BD Biosciences	610748	Residuos 26-156	Anti-mouse IgG2a
Anti-GAPDH	1:1000	Abcam	Ab9485	Proteína completa	Anti-conejo
Anti-GAPDH	1:10,000	Abcam	Ab8245	Información no proporcionada	Anti-ratón
Anti-myc epitope	1:1000	Cell signaling	2276	Residuos 410-419 de c-Myc humana (EQKLISEEDL)	Ratón IgG2a
Anti-FLAG	1:1,000	Sigma	F3165	Secuencia Asp-Tyr-Lys-Aps-Asp-Asp-Asp-Lys	Anti-ratón
Anti a-tubulina	1:10,000	Abcam	Ab7291	Proteína nativa completa	Anti-ratón

- Diluir el anticuerpo secundario en TBST para quimioluminiscencia o PBS/Tween 0.2%/SDS 0.1% para fluorescencia, de acuerdo a la hoja técnica, e incubar de 30 a 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos usados en fluorescencia deben ser protegidos de la luz.

Tabla 11. Anticuerpos secundarios usados en ensayos de western blot			
Anticuerpo secundario	Dilución	Marca	Número de catálogo
Anticuerpos para revelado por quimioluminiscencia			
Anti-conejo	1:16,000	Sigma	A 0545
Anti-ratón	1:10,000	Amersham	NA 931
Anti-cabra	1:10,000	Sigma	A 9452
Anticuerpos para revelado por fluorescencia			
Anti-conejo IRDye 800	1:15,000	Rockland	611-732-127
Anti-ratón IRDye 700	1:10,000	Rockland	610-732-124
Anti-ratón DyLight 800	1:15,000	Thermo Scientific	35521

- Lavar 3 veces con volúmenes grandes de TBST para quimioluminiscencia o PBS/ Tween 0.2% para fluorescencia, en agitación por 5 minutos cada vez, para eliminar el anticuerpo no adherido.

g) Revelado por quimioluminiscencia:

- 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 las siguientes exposiciones 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 secuencialmente en revelador, agua, fijador y nuevamente por agua; aproximadamente 1 minuto en cada uno.
- Indicar el peso molecular en el film de acuerdo al marcador de proteínas.

h) Revelado por fluorescencia:

- Encender el escáner (Odyssey, LI-COR) e iniciar el programa Odyssey V3.0.
- Limpiar perfectamente el cristal del escáner, procurando dejar la superficie libre de basuras.

3. Con ayuda de unas pinzas, colocar la membrana sobre el cristal y humedecerla un poco para evitar que se seque. Eliminar cualquier burbuja que pudiera haber entre la membrana y el cristal.
 4. En el programa Odyssey V3.0, seleccionar el modo membrana y especificar las coordenadas de la misma.
 5. Habilitar la casilla que indica el número del fluoróforo al que está acoplado el anticuerpo secundario usado.
 6. Iniciar el escaneo con intensidad 5, la intensidad en los siguientes escaneos se disminuirá o aumentará de acuerdo a la señal detectada en la primera exposición.
 7. Guardar los archivos obtenidos para su posterior análisis y edición.
- i) **Análisis densitométrico.** El análisis de las imágenes se llevó a cabo en el programa ImageJ, en el que se usó GAPDH para la normalización de datos.
- j) **Limpieza de membranas:**
1. Lavar la membrana 10 minutos en TBST a temperatura ambiente y en agitación.
 2. Incubar la membrana 30 minutos con la solución de limpieza de membranas a 50°C, agitando ocasionalmente.
 3. Lavar 2 veces por 10 minutos cada vez, en agitación y a temperatura ambiente, con un volumen grande de TBST.
 4. Repetir los pasos para bloquear.
 5. Exponer la membrana para verificar que se lavó el anticuerpo anterior.
 6. Lavar 2 veces por 5 minutos cada vez, con TBST, en agitación y a temperatura ambiente.
 7. Repetir los pasos de incubación con anticuerpos y revelado.

3. Ensayo de actividad transcripcional

a) Extractos celulares

DÍA 1. Cultivar 1.4×10^5 células en platos de cultivo de 24 pozos con 500 μ l de medio.

DÍA 2. Transfectar las células con los plásmido de interés, como se indica en la sección de Biología Celular. Se sugiere permitir la expresión de las construcciones de interés por 48 horas, previas a la lisis celular, para permitir una mayor producción de la proteína a detectar; sin embargo, los tiempos dependerán de las exigencias del experimento. En los ensayos de actividad transcripcional se sugiere constancia en los tiempos empleados, para evitar variaciones en los resultados.

DÍA 4. Hacer la lisis celular de la siguiente manera:

1. Lavar cada pozo con 500 μ l de PBS frío, sin desprender las células del plato de cultivo.

2. Agregar inhibidores de proteasas y/o fosfatasa al buffer de lisis para genes reporteros (RLB buffer, Promega # E3971).

3. Agregar 100 μ l de buffer de lisis por pozo e incubar 5 minutos a -70° C.

4. Desprender las células por agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

5. Recolectar los extractos celulares de los pozos y transferir a tubos eppendorf de 1.5 ml.

6. Centrifugar 5 minutos a 9,500 g a 4° C.

7. Recuperar el sobrenadante en un tubo W nuevo.

8. Cuantificar la cantidad de proteína por ensayo de Bradford, posteriormente ayudará a la normalización de datos.

9. Almacenar a -70° C hasta su uso. Se debe evitar congelar y descongelar los extractos celulares, por ello se sugiere hacer alícuotas.

b) Medición de la actividad de β -galactosidasa

1. A cada muestra, agregar:

150 μ l buffer β -galactosidasa

30 μ l de extractos celulares

120 μ l de buffer de lisis para genes reporteros

2. Incubar a 37° C por 30 minutos

3. Detener la reacción con 500 μ l de Na_2CO_3 1 M, frío.

4. Medir la absorbancia a 420 nm.

c) Medición de la actividad de luciferasa

1. Dividir el total de las muestras en lotes para facilitar la manipulación de las mismas.

2. Descongelar los extractos celulares en hielo.

3. Equilibrar el sustrato para la luciferasa (Promega # E4030) a temperatura ambiente. La actividad de la luciferasa es sensible a la temperatura, por ello los tubos para luminómetro no deben colocarse en hielo.

4. En un tubo para luminómetro, o en su defecto en tubos eppendorf de fondo claro, agregar 10 μ l del sustrato para luciferasa y 30 μ l de extracto celular.

5. Colocar en el luminómetro la muestra y medir la actividad de luciferasa durante 10 segundos, tomar la lectura y esperar 5 segundos entre cada muestra.

6. La normalización de los datos se obtienen al dividir las lecturas obtenidas de la actividad de luciferasa, β -galactosidasa y la cuantificación de proteína. La actividad transcripcional se determina como veces de inducción de la actividad de luciferasa a partir de los datos obtenidos de por lo menos tres experimentos independientes.

B. Biología Celular

1. Mantenimiento de la línea HEK293T: se parte de un plato de cultivo de 10 cm con aproximadamente 12×10^6 células.

1. Aspirar el medio con una bomba de vacío.
2. Lavar con 3 ml de PBS a temperatura ambiente, dejándolo caer cuidadosamente sobre la pared del plato, no sobre las células.
3. Aspirar el PBS a través de la bomba de vacío.
4. 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.
5. Añadir 9 ml de medio DMEM suplementado fresco, previamente calentado a 37° C, y dispersar las células pipeteando suavemente.
6. Transferir el disgregado a un tubo Falcon de 50 ml (Corning # 430828).
7. Centrifugar 5 minutos a 1000 rpm.
8. 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.

a) Cuantificación de densidad celular:

1. Una vez disgregadas las células, de acuerdo a los pasos para el mantenimiento de la línea, colocar 10 μ l del disgregado en cada ranura de un hemocitómetro.
2. Contar un mínimo de 100 células totales. Considerar que un cuadrante equivale a 0.1 μ l para extrapolar el conteo al volumen final en el que se resuspendió la pastilla.
3. Para el mantenimiento de la línea celular se siembran 1×10^6 células en un plato de 10 cm (Costar # 430167) en el volumen final de 10 ml con medio DMEM suplementado. Para el resto de los experimentos sembrar el número de células sugeridas para cada caso.
4. Tanto para el mantenimiento de la línea celular como para sembrar en cajas multipozos, es recomendable hacer un master mix en un tubo de 15 ml (Corning # 430790), para asegura una distribución más homogénea de las células dentro del plato de cultivo.
5. Incubar a 37° C y 5% de CO₂ en humedad.

2. Congelamiento:

1. Disgregar las células de acuerdo a los pasos para mantenimiento de la línea.
2. Resuspender la pastilla en el volumen requerido para obtener una densidad celular de 6×10^6 células/ml.
3. Agregar la misma cantidad de medio de congelación 2X y de células. Mezclar cuidadosamente y hacer alícuotas de 1 ml en crioviales (Corning # 2028), previamente etiquetados con tipo celular, fecha y densidad celular (3×10^6 células/vial).
4. Congelar a -70°C por un día, posteriormente transferir a nitrógeno líquido para un almacenaje prolongado.

3. Descongelamiento:

1. Incubar el criovial (Corning # 2028) por 1 a 2 minutos a 37°C en baño de agua.
2. 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 .
3. Agitar un par de veces por pipeteo y centrifugar 5 minutos a 1000 rpm.
4. Aspirar el sobrenadante con la bomba de vacío y resuspender en 10 ml de medio DMEM suplementado.
5. Sembrar en un plato de cultivo de 10 cm.
6. Al día siguiente, cambiar el medio por fresco.

4. Transfección de ADN:

a) Transfección transitoria por CaCl₂:

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.

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

	Platos de 10 cm (Costar # 430167)		Platos de 35 mm (Corning # 430165)	
	1 plásmido	Co-transfección	1 plásmido	Co-transfección
Agua grado cultivo	244.12 µl	-	38.75 µl	-
ADN (1 µg/µl)	31.5 µg	15 µg (por cada plásmido)	5 µg	3 µg (por cada plásmido)
	Mezclar perfectamente			
CaCl ₂ 2M	39.37 µl	39.37 µl	6.25 µl	6.25 µl
	Incubar 10 minutos a temperatura ambiente y agregar:			
HBS 2x	315 µl	315 µl	50 µl	50 µl
Volumen total	613 µl	613 µl	100 µl	100 µl

2. Incubar inmediatamente 2 minutos a 37°C.
3. Agregar la mezcla al cultivo, por goteo y agitar delicadamente el cultivo para dispersar la mezcla.
4. Incubar a 37° C y 5% de CO₂ en humedad.

DÍA 3. Cambiar la solución de transfección por medio DMEM suplementado fresco, 12 a 17 horas posteriores a la transfección.

b) Transfección transitoria por lipofección:

DÍA 1. Sembrar 1.5 x 10⁵ células en 1 ml de medio para lipofección, para cajas de 12 pozos o 4.5 x 10⁵ células en 2 ml de medio, para platos de 35 mm; 24 horas previas a la transfección. Es importante que el medio no contenga antibióticos, porque la lipofectamina 2000 usada en la transfección hace sensibles a las células a los antibióticos. También es importante la confluencia celular, por lo que es deseable contar con un 80% de confluencia al momento de la transfección.

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

1. En tubos eppendorf de 1.5 ml, mezclar para cada muestra:

Tabla 13. Proporciones usadas al lipofectar células HEK293T						
	Plásmidos				siRNA	
	Platos de 35 mm		Caja de 12 pozos		Caja de 12 pozos	
	Solución A	Solución B	Solución A	Solución B	Solución A	Solución B
OPTIMEM (Gibco #11058021)	99 μ l	97 μ l	49 μ l	47 μ l	El necesario para aforar a 50 μ l	47 μ l
ADN (1 μ g/ μ l)	1 μ l	-	1 μ l	-	50 pmol (final)	-
siRNA	-	-	-	-	-	-
Lipofectamina 2000 (Invitrogene #11668)	-	3 μ l	-	3 μ l	-	3 μ l
Volumen total	100 μ l	100 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

- Una vez hecha las soluciones en cada tubo, incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Al concluir los 5 minutos, mezclar la solución A y B. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos.
- Para platos de 35 mm, agregar 200 μ l de la mezcla sobre al cultivo; para cajas de 12 pozos, agregar 100 μ l por pozo por goteo y agitar delicadamente el plato para dispersar la mezcla.
- Incubar a 37° C y 5% de CO₂ en humedad.
- 4 horas posteriores a la lipofección, cambiar el medio por medio de lipofección nuevo e incubar a 37° C y 5% de CO₂ en humedad.
- Cuando el experimento requiera la lipofección previa de siRNA, la lipofección de ADN puede llevarse a cabo a las 4 horas posteriores a la primera transfección, aunque es más conveniente dejar recuperar a las células 24 horas, además de dar un mayor tiempo para el efecto del siRNA y que las células se recuperen.

Tabla 14. Secuencias de siRNAs		
siRNA	Secuencia blanco	Número de catálogo
Atg7	CCAACACACUCGAGUCUUU GAUCUAAAUCUCAAACUGA GCCACAGAUGGAGUAGCA GCCAGAGGAUUCAACAUGA	ON-TARGET plus LQ-020112-00-0002
Beclina-1	GAUACCGACUUGUCCUUA GGAACUCACAGCUCCAUUA CUAAGGAGCUGCCGUUAUA GAGAGGAGCCAUUUUAUUGA	ON-TARGET plus LQ-010552-00-0002

c) **Lipofección de genes reporteros para ensayos de actividad transcripcional:**

DÍA 1. En cajas de 24 pozos, sembrar de 1.2×10^5 células en 500 μ l de medio para lipofección, por pozo, 24 horas previas a la transfección.

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

1. En un tubo eppendorf de 1.5 ml, mezclar para cada muestra, según el caso:

Tabla 15. Proporciones usadas al transfectar ensayos de genes reporteros						
Condición	Construcción	Tamaño (pb)	Solución A		Solución B	
			Concentración final de DNA* (ng)	OPTIMEM	Lipofectamina 2000	OPTIMEM
MOCK	POMC-minimal promoter	6250	197	El volumen necesario para aforar 25 μ l	1.3 μ l	El volumen necesario para aforar 25 μ l
	LacZ	7128	224			
	FLAG-Nur77-WT	7228	228			
EXPERIMENTAL	NBRE 3X-Luc	6334	200	El volumen necesario para aforar 25 μ l	1.3 μ l	El volumen necesario para aforar 25 μ l
	LacZ	7128	224			
	Construcción a probar	7228	228			

* La cantidad de cada plásmido usado debe ser equimolar con respecto a la construcción NBRE 3X-Luc, para ello es importante considerar que el tamaño de los plásmidos cotransfectadas, ya que 1 pmol de 1000 pb equivale a 0.66 μ g y se partió de 0.022 pmoles de NBRE-3X-Luc.

2. Una vez hecha las soluciones en cada tubo, incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Al concluir los 5 minutos, mezclar la solución A y B. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos.
4. Para platos de 35 mm, agregar 200 μ l de la mezcla sobre al cultivo; para cajas de 12 pozos, agregar 100 μ l por pozo, por goteo y agitar delicadamente el plato para dispersar la mezcla.
5. Incubar a 37° C y 5% de CO₂ en humedad.
6. 4 horas posteriores a la lipofección, cambiar el medio de crecimiento por medio de lipofección nuevo e incubar a 37° C y 5% de CO₂ en humedad.

5. Modelo de muerte celular inducida por SP/NK₁R:

- 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 la construcción que codifica para NK₁R o pcDNA3.1 como control negativo; de acuerdo al método de transfección transitoria.
- DÍA 3. 24 horas después de la transfección, agregar agua grado cultivo o SP a una concentración 100 nM final, para obtener las siguientes combinaciones:

- pcDNA3.1- + H₂O
- pcDNA3.1- + SP
- NK₁R + H₂O
- NK₁R + SP

DÍA 4. 24 horas posteriores a la adición de SP se determina la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano.

6. Modelo de muerte celular inducida por IGF1R:

- 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 la construcción que codifica para IGF1R o pcDNA3.1 como control negativo; de acuerdo al método de transfección transitoria.
- DÍA 4. 24 horas posteriores a la transfección se determina la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano.

7. Determinación de viabilidad por exclusión de azul de tripano:

1. Agitar ligeramente el plato de cultivo que contienen las células a las cuales se va a determinar la viabilidad celular.
2. Tomar el medio con una pipeta y transferirlo a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
3. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos, en microcentrífuga.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender en 50 µl de azul de tripano 10%.
5. Cuantificar las células que incorporaron el azul de tripano (muertas) en un hemocitometro y extrapolar el número de células muertas totales. Debe considerarse que cada cuadrante equivale a 0.1 µl.
6. Determinar la proporción de células muertas de cada condición con respecto al número de células muertas totales del experimento completo.

X. RESULTADOS

A. La muerte mediada por Nur77 requiere de proteínas de la maquinaria central de la autofagia.

La técnica de ARN interferente (siRNA, por sus siglas en inglés) permite silenciar la expresión de proteínas de manera específica. Para determinar si la muerte mediada por Nur77 requiere de proteínas de la maquinaria central de la autofagia se utilizaron siRNAs para silenciar específicamente a las proteínas autofágicas Atg7 o Beclina-1 (siAtg7 o siBeclina-1, respectivamente), tanto en la muerte inducida por IGF1R como por SP/NK₁R.

En el modelo de muerte inducida por IGF1R se lipofectó el siAtg7, siBeclina-1 o un siRNA irrelevante (contra NSP1 de rotavirus, donación de la Dra. Susana López), 24 horas previas a la transfección de la construcción que expresa IGF1R. Debido a que la sola expresión del receptor induce la muerte, en un experimento a la par, se transfectó el vector vacío pcDNA3.1- como control, con los mismos interferentes. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripano, 24 horas posteriores a la transfección de IGF1R, tiempo suficiente para observar la muerte autofágica.

De manera similar, en la muerte inducida por SP/NK₁R, los siRNAs mencionados se lipofectaron 24 horas previas a la transfección de NK₁R. Las células se estimularon con 100 nM de SP o agua como control. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripano, 24 horas posteriores al estímulo con SP.

Para ambos modelos, se determinó la proporción de células muertas para cada condición con respecto al número de células muertas en el experimento completo. Como se muestra en la **Figura 14**, la lipofección de siAtg7 y siBeclina-1 ocasionó una disminución significativa de la muerte celular inducida tanto por la expresión de IGF1R como por la interacción entre la SP y NK₁R, lo que no ocurrió con la lipofección del siRNA irrelevante. El silenciamiento de ambas proteínas se demostró por análisis tipo western blot (**Figura 14C**). Por lo tanto, la inhibición de la traducción de Atg7 y Beclina-1, disminuye la muerte mediada por Nur77.

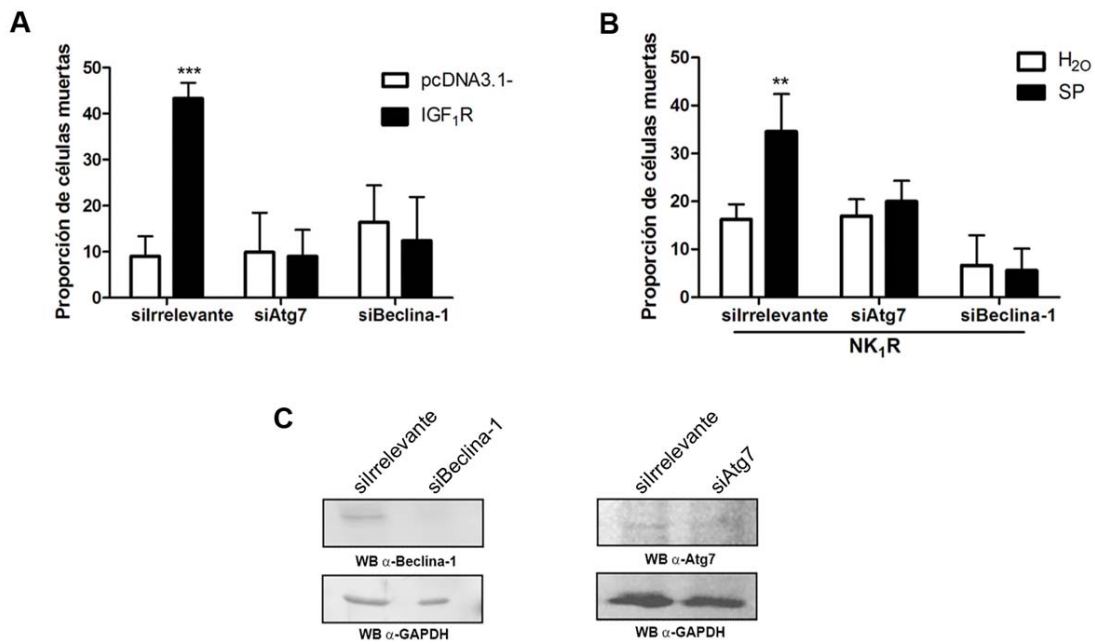


Figura 14. Atg7 y Beclina-1 son necesarias para la muerte mediada por Nur77. Proporción de células muertas a las 24 horas, al interferir con la expresión de Atg7 o Beclina-1, en presencia o ausencia de IGF1R, **A**, o por la interacción entre SP y NK₁R, **B**. Las barras representan la desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por un análisis de ANOVA de dos vías. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 4$. **C**. Eficiencia del silenciamiento por siAtg7 y siBeclina-1. Las proteínas totales fueron obtenidas de células previamente lipofectadas con los siRNAs indicados para cada caso. El análisis se realizó por ensayo tipo western blot y la detección de la proteína GAPDH se utilizó como control de carga.

B. La inactivación de Nur77 disminuye la cantidad de LC3 en la muerte inducida por IGF1R.

En estudios previos se había observado el aumento de la modificación de LC3 durante la muerte mediada por Nur77. Dicha acumulación podría deberse al aumento de la autofagia, o bien a una interrupción en el flujo del proceso autofágico, como podría ocurrir con la inhibición de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. La comparación del grado de procesamiento de LC3-II en presencia de cloroquina, un inhibidor de enzimas lisosomales, es una estrategia para determinar si el flujo de la autofagia no está interrumpido durante nuestro modelo de muerte celular. Con este fin, se analizó el grado de procesamiento de LC3-II durante la muerte inducida por la sobreexpresión de IGF1R, en presencia o ausencia de cloroquina. Como se observa en la **Figura 15A**, la adición de cloroquina aumentó la acumulación de LC3-II aún en presencia de IGF1R, indicando que el flujo de la autofagia es continuo durante la muerte mediada por IGF1R. Sin embargo, en este experimento no se confirmó el aumento de LC3-II observado previamente, pues no se observan diferencias al comparar la cantidad de LC3-II en presencia de IGF1R respecto a células transfectadas con el vector vacío.

A partir de los valores relativos obtenidos de la densitometría, se obtuvo el cociente de LC3-II/LC3-I, el cual se utiliza como un indicio del incremento o disminución de la autofagia. En el tratamiento con cloroquina, ya sea en ausencia o presencia de IGF1R, el valor del cociente fue cercano a 1, distinto a lo que se observa en el tratamiento con agua **Figura 15A** (gráfica inferior), lo que refuerza la continuidad del flujo en el modelo de muerte inducida por IGF1R.

Paralelamente, se buscó determinar si el procesamiento de LC3 es dependiente de la actividad de Nur77, mediante la co-expresión de IGF1R y una mutante dominante negativa (Nur77 DN, Nur77 Δ N152), que inhibe la muerte celular (Bouzas-Rodríguez, 2006). Con este fin, se cuantificó la proporción de LC3-I y LC3-II por densitometría, a partir de la señal obtenida por análisis tipo western blot. Como se muestra en la **Figura 15B**, en presencia de IGF1R no se observó un incremento de LC3-II, tampoco se detectó algún cambio con la expresión de la mutante Nur77 DN. Lo que sí se observó fue una disminución en la cantidad total de LC3 en presencia de IGF1R y Nur77 DN. En cuanto al LC3-II/LC3-I, al comparar en presencia o ausencia de IGF1R, se observó un incremento ligero del cociente en presencia de IGF1R, lo que sugiere una disminución de la diferencia entre LC3-I y LC3-II (**Figura 15A**). Cuando se coexpresan IGF1R con Nur77 DN, el cociente es un poco mayor (**Figura 15A**). Sin embargo, es necesario contar con más repeticiones para hacer un análisis estadístico y determinar la significancia de las diferencias. Estos resultados sugieren que Nur77 podría mediar el aumento de LC3 durante la muerte inducida por IGF1R, lo cual no se debe al bloqueo de la degradación de la autofagia; sin embargo, estos ensayos no permitieron visualizar claramente los cambios modestos en el procesamiento de LC3 durante la muerte inducida por IGF1R.

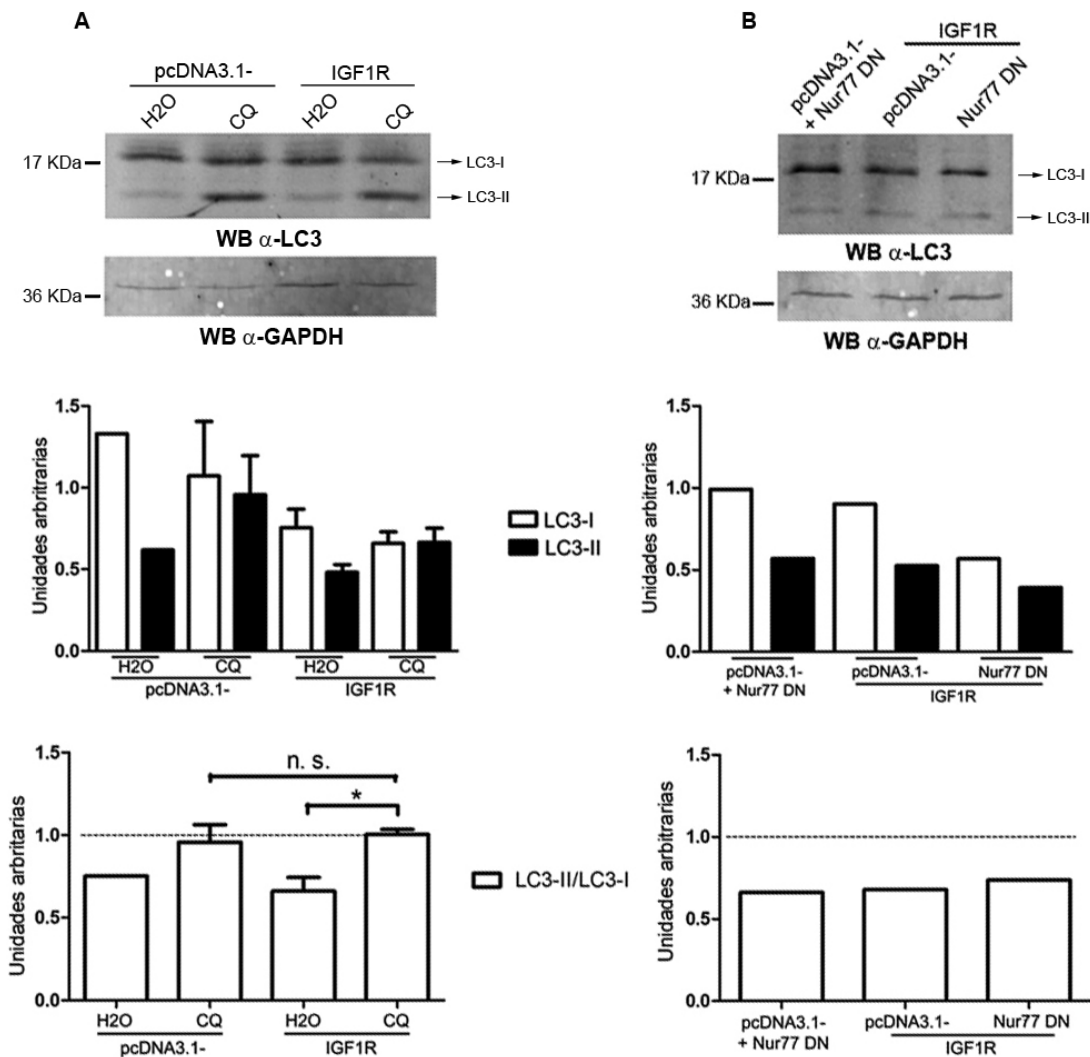


Figura 15. El flujo de la autofagia no se interrumpe durante la muerte inducida por IGF1R. A, western blot para determinar la abundancia de LC3 en células transfectadas con los vectores indicados, en ausencia o presencia de cloroquina, un inhibidor de enzimas lisosomales. . Las barras representan la desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por un análisis de t Student. *p <0.05, n=3. B, detección de LC3 en presencia de los vectores indicados, para determinar si la inhibición de Nur77 altera el procesamiento de LC3, n=2. Las gráficas intermedias indican la normalización de LC3 con respecto a GAPDH, mientras que las gráficas inferiores indican el cociente LC3-II/LC3-I. CQ hace referencia a cloroquina.

C. Evaluación del papel de la sumoilación durante la muerte celular mediada por Nur77.

1. La inhibición general de la sumoilación disminuye la muerte con características autofágicas.

Para evaluar el efecto de la sumoilación sobre la muerte inducida por Nur77, utilizamos la proteína viral Gam1, la cual inhibe la sumoilación, a través de inducir la degradación de la E1 (SAE1/SAE2) y la E2 (Ubc9) (Boggio *et al.*, 2004, Boggio *et al.*, 2007). Inicialmente comprobamos el efecto inhibitorio de Gam1 sobre la sumoilación en nuestro modelo, al analizar tanto los niveles de Ubc9 como el patrón de sumoilación global por SUMO-1 y SUMO-2/-3 a diferentes tiempos, ya que el tiempo de expresión de Gam1 es importante para observar sus efectos (Wu *et al.*, 2007). Como se puede apreciar en la **Figura 16A**, la cantidad de Gam1 detectada a las 24 horas pos-transfección es prácticamente imperceptible, pero a las 48 horas la detección es clara. Sin embargo, desde las 24 horas de expresión de Gam1 se observó la disminución de Ubc9 (**Figuras 16B**), que se mantiene a lo largo del tiempo.

La expresión de Gam1 no disminuyó notoriamente la sumoilación global por SUMO-1, aunque se observaron diferencias en bandas específicas. Se muestra la densitometría de una de ellas en la **Figura 16C**. Al observar proteínas conjugadas a SUMO-2/-3, desde las 24 horas de expresión de Gam1 se observó una disminución general, más notoria a mayor tiempo de expresión (**Figuras 16D**). Estos resultados sugieren que aún niveles bajos de expresión de Gam1 son suficientes para provocar un efecto inhibitorio sobre la sumoilación, al reducir Ubc9 y proteínas conjugadas a SUMO-1 y SUMO-2/-3.

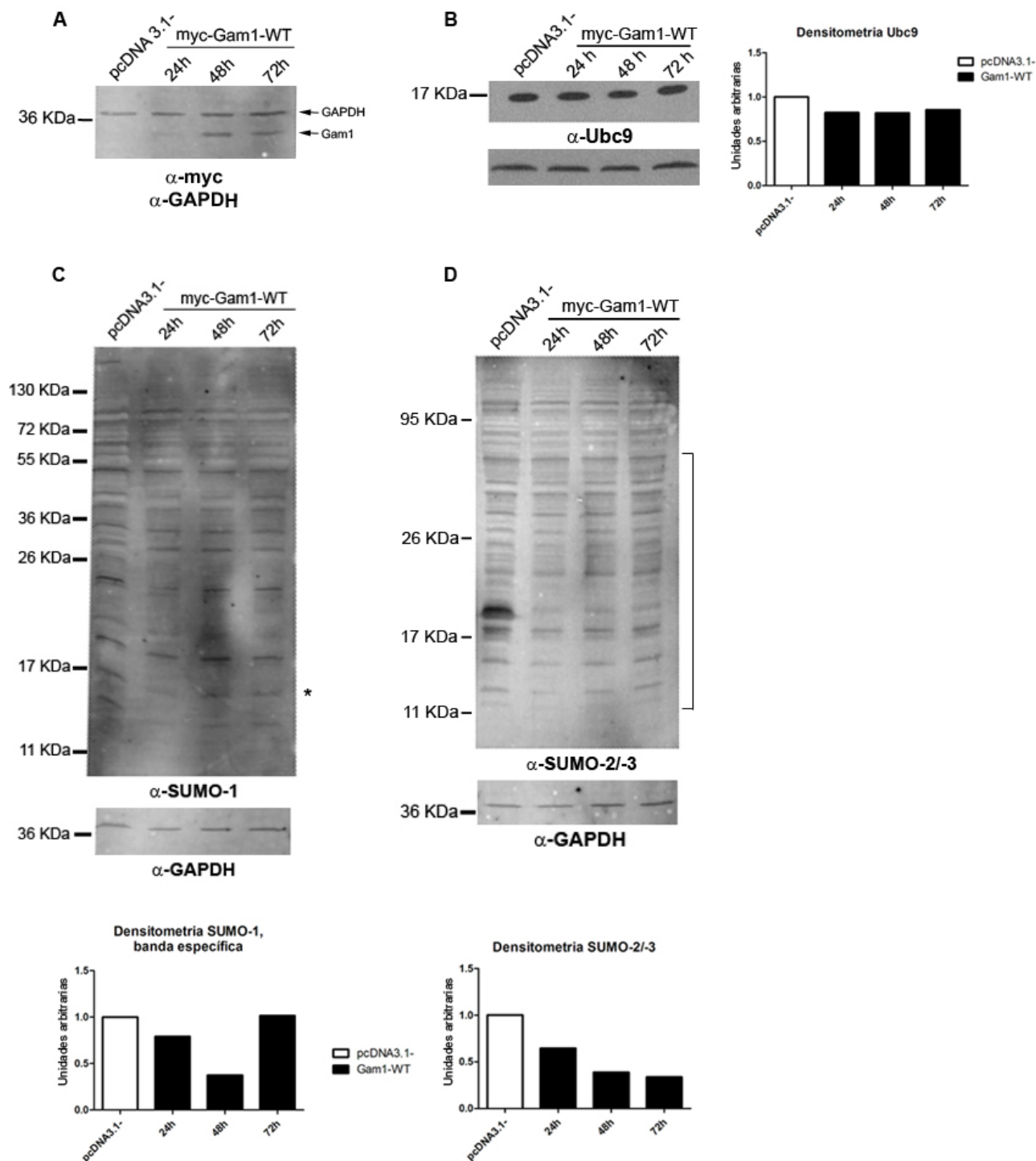


Figura 16. La expresión de Gam1 disminuye la sumoilación. A, La expresión de Gam1 (anti-myc) aumenta a las 48 horas de transfección. B, La cantidad de Ubc9 disminuye modestamente en presencia de Gam1. C, La sumoilación global por SUMO-1 no disminuye, pero sí de bandas específicas, con el asterisco se indica la banda seleccionada para la densitometría mostrada en la gráfica inferior. D, la sumoilación global de SUMO-2/-3 disminuye en presencia de Gam1, se muestra con un corchete la región cuantificada por densitometría, que se grafica abajo. Las proteínas totales fueron obtenidas de células transfectadas con los vectores y durante los tiempos indicados. El análisis se realizó por ensayo tipo western blot, se detectó GAPDH como control de carga. La normalización de Ubc9 se hizo con respecto a una banda inespecífica en el mismo blot. n=2 para Ubc9, n=1 para SUMO-1 y SUMO-2/-3.

Para determinar si la sumoilación influye en la muerte autofágica, se cuantificó la muerte celular inducida por SP/NK₁R en ausencia o presencia de Gam1. Como se muestra en la **Figura 17**, al expresar Gam1 se observó la disminución significativa de la muerte inducida por SP/NK₁R, lo que sugiere que la sumoilación de proteínas es necesaria para que se dé la muerte autofágica.

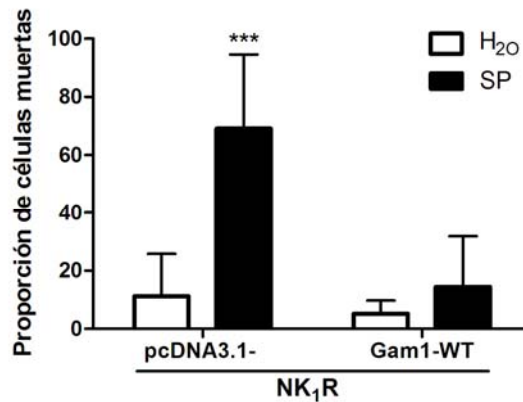


Figura 17. La expresión de Gam1 inhibe la muerte autofágica. Proporción de células muertas al cotransfectar las construcciones indicadas en cada caso. Las barras representan la desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por un análisis de ANOVA de dos vías. ***p<0.001. n=4.

Sin embargo, cuando se analizó el efecto de la expresión de Gam1 sobre los niveles de Ubc9 durante la muerte autofágica, se observó una mayor cantidad de Ubc9 respecto a los controles (**Figura 18A**).

También se analizaron los patrones globales de sumoilación por SUMO-1 y SUMO-2/-3. Como se observa en la **Figura 18C**, no se aprecia una diferencia evidente en el patrón de sumoilación con o sin Gam1; sin embargo, al cuantificar las bandas por densitometría, se detectaron ciertos cambios. En cuanto a los conjugados a SUMO-1, hubo un aumento ligero en presencia de Gam1, (**Figura 18C**), el cual también se observa con SP aunque es menor.

Para el caso de SUMO-2/-3, la expresión de Gam1 también incrementó la sumoilación general con respecto a las células transfectadas con pcDNA3.1. Lo que no se observó con SUMO-1 pero si con SUMO-2/-3, fue el aumento de los conjugados al inducir la muerte autofágica en ausencia de Gam1 (**Figura 18D**), lo que sugiere la formación preferencial de complejos con SUMO-2/-3 en la muerte celular. También resulta interesante que al aumentar los conjugados a SUMO-2/-3 con NK₁R y SP, disminuyó la cantidad de Ubc9 (**Figura 18B y D**). Sin embargo, con estos resultados no se puede concluir que el efector protector de Gam1 sobre la muerte celular se deba a su efecto inhibitorio sobre la sumoilación.

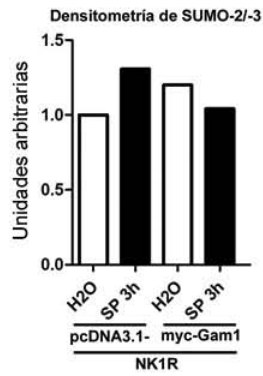
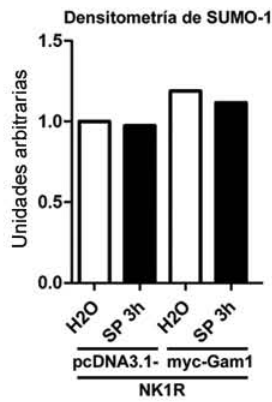
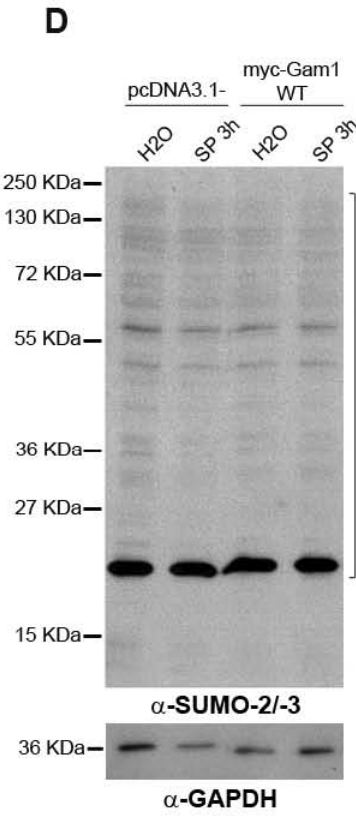
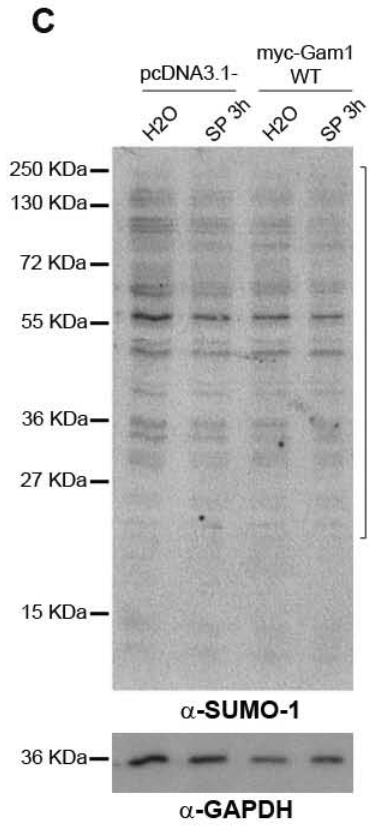
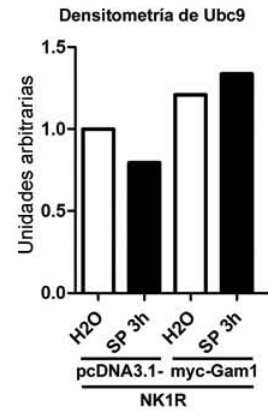
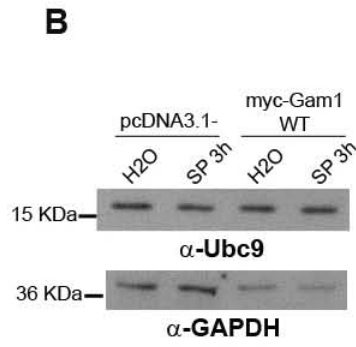
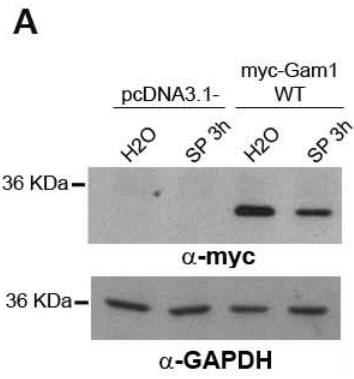


Figura 18. La expresión de Gam1 no afectó la sumoilación general de proteínas en el modelo de muerte. **A**, comprobación de la expresión de Gam1 (anti-myc). **B**, el nivel de Ubc9 no disminuyó en presencia de Gam1, durante la activación de la muerte autofágica. **C**, la presencia de Gam1 no disminuyó la sumoilación global por SUMO-1 durante la muerte autofágica. **D**, la presencia de Gam1 no disminuyó la sumoilación por SUMO-2/-3 durante la activación de la muerte autofágica. Las proteínas totales fueron obtenidas de células previamente cotransfectadas con las construcciones indicadas en cada caso, además de ser estimuladas o no con 100 nM de SP por 3h. El análisis se realizó por ensayo tipo western blot y la detección de la proteína GAPDH se utilizó como control de carga. Las gráficas indican la densitometría a partir de los WB correspondientes. Los corchetes en los costados derechos señalan el área considerada para la densitometría. n=1.

2. La sobreexpresión de Ubc9 bloquea la muerte autofágica.

Para corroborar si el efecto inhibitorio de Gam1 sobre la muerte es a través de la inhibición de la sumoilación, se buscó una estrategia para inhibir la actividad de Ubc9. La cisteína 93 de Ubc9 forma parte de su dominio catalítico, su sustitución por una serina (Ubc9-C93S) ocasiona que pierda la capacidad de formar el enlace tioéster con SUMO y al expresarse tiene un efecto de mutante dominante negativa sobre Ubc9 endógena (Poukka *et al.*, 1999, Yokota *et al.*, 2007); por lo tanto, se generó y expresó la mutante Ubc9-C93S para estudiar si la sumoilación juega un papel importante en la muerte autofágica.

Se construyó la mutante Ubc9-C93S por mutagénesis sitio dirigida (la estrategia se detalla en Materiales y métodos). La sustitución se demostró por secuenciación (Figura 19A) y su expresión se comprobó mediante ensayo tipo western blot (Figura 19B). Ubc9 es una proteína de aproximadamente 18 KDa, como puede observarse en la Figura 19B, y la adición del epítipo SV5, un péptido de nueve aminoácidos, incrementó su tamaño alrededor de dos kilodaltones con respecto a la proteína endógena (Figura 19B).

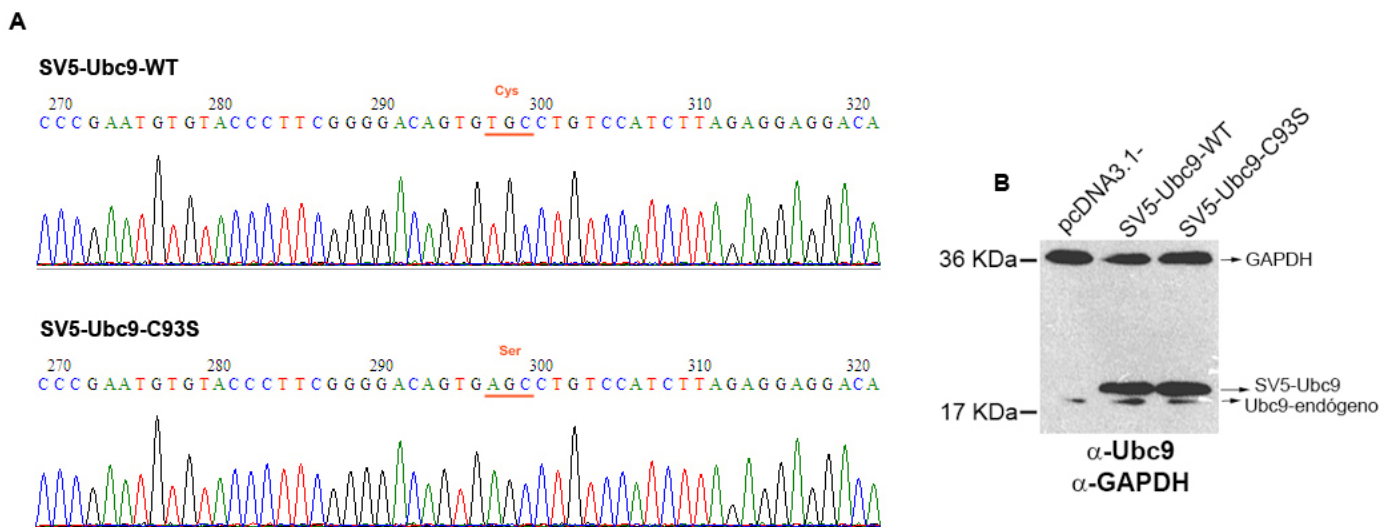


Figura 19. Secuenciación y expresión de la mutante inactiva de Ubc9. **A**, secuenciación de Ubc9 silvestre (cromatograma superior) y de la mutante Ubc9-C93S (cromatograma inferior). Las líneas naranjas señalan el codón que codifica para el aminoácido indicado. **B**, detección por ensayo tipo western blot de Ubc9 y GAPDH, que se utilizó como control de carga. Las proteínas totales fueron obtenidos de células previamente transfectadas con la construcción indicada.

Para determinar si la inhibición de Ubc9 evita la muerte inducida por SP/NK₁R, se expresó la mutante Ubc9-C93S o se sobreexpresó la proteína silvestre como control. Distinto a lo esperado, la sobreexpresión de Ubc9 silvestre disminuyó significativamente la muerte autofágica, mientras que la mutante Ubc9-C93S no tuvo un efecto significativo (**Figura 20**). Estos resultados se contraponen con el efecto observado al expresar Gam1, pues tanto un inhibidor como un activador de la sumoilación inhibieron la muerte autofágica.

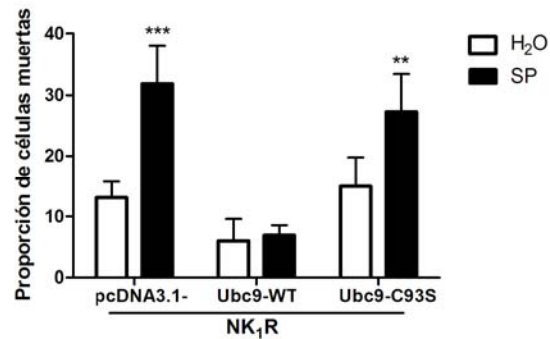


Figura 20. La sobreexpresión de Ubc9 inhibe la muerte autofágica significativamente, mientras que la mutante inactiva de Ubc9 no. Proporción de células muertas al cotransfectar las construcciones indicadas en cada caso. Las barras representan la desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por un análisis de ANOVA de dos vías. **p < 0.01, ***p < 0.001. n=3.

Se analizó el efecto tanto de Ubc9 silvestre como de la mutante Ubc9-C93S sobre la sumoilación. Como se muestra en la **Figura 21**, no se aprecia el aumento global de conjugados a SUMO al sobreexpresar Ubc9, ni la disminución al expresar Ubc9-C93S, tanto para SUMO-1 (**Figura 21A**) como para SUMO-2/-3 (**Figura 21A**). En presencia de Ubc9-C93S se observaron diferencias en algunas bandas específicas, particularmente en las de menor peso molecular conjugadas a SUMO-2/-3, ya que al hacer un análisis densitométrico de algunas de ellas no se observaron diferencias significativas (**Figura 21B**, gráfica). Tanto para SUMO-1 como para SUMO-2/-3 se observó un aumento en la disponibilidad de SUMO libre en presencia de Ubc9-C93S.

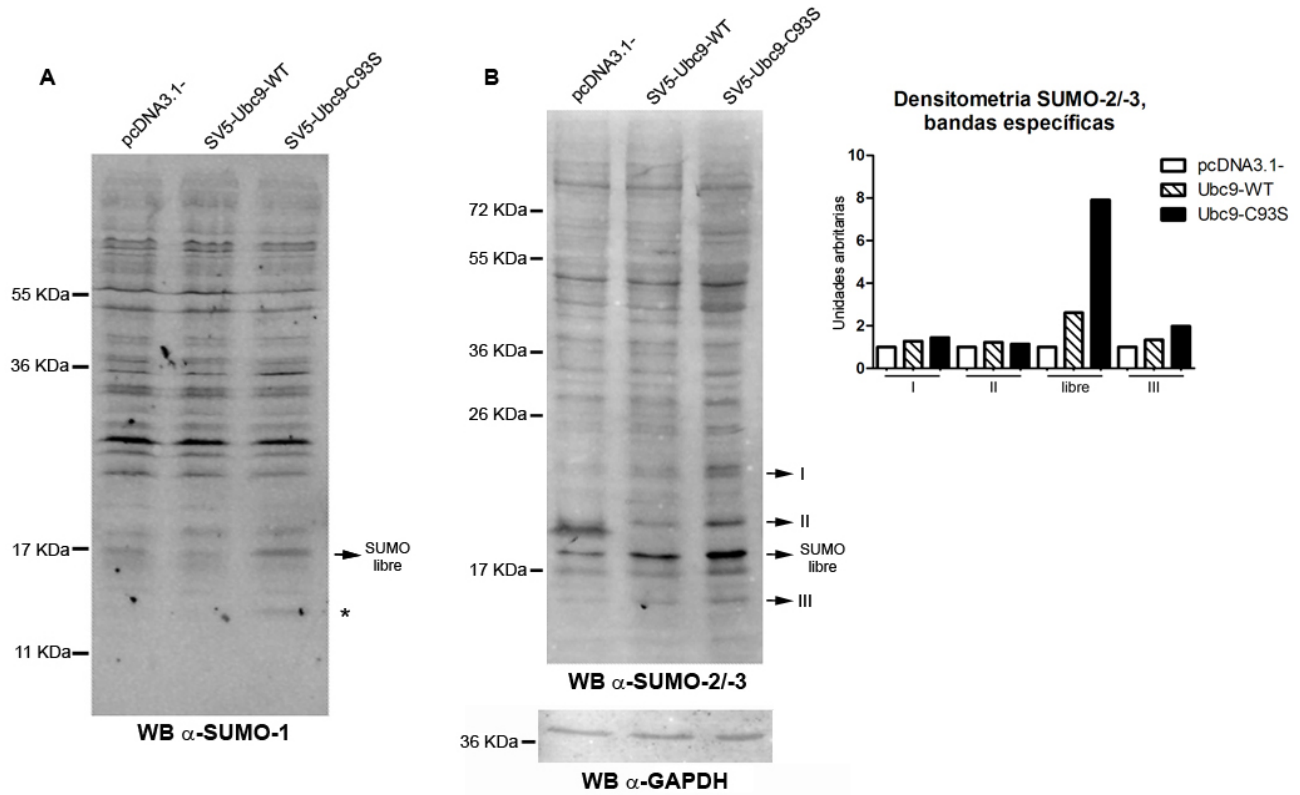


Figura 21. La sobreexpresión de Ubc9-C93S alteró la disponibilidad de SUMO libre. A, la sumoilación global por SUMO-1 o B, SUMO-2/-3, no se alteró al sobreexpresar Ubc9 o Ubc9-C93S. Las proteínas totales fueron obtenidas de células transfectadas con las construcciones indicadas para cada caso. El análisis se realizó por ensayo tipo western blot y la detección de la proteína GAPDH se utilizó como control de carga. La densitometría se realizó a partir de las bandas específicas señaladas con flechas en la Figura B. El asterisco indica una proteína de peso molecular bajo que parece aumentar.

D. Generación de proteínas mutantes de Nur77 en sitios predichos para la sumoilación o fosforilación.

1. Inserción de FLAG N-terminal a Nur77.

El efecto protector de Gam1 sugirió inicialmente que la sumoilación podría ser un mecanismo para regular la muerte autofágica, y previamente se observó la sumoilación de Nur77. Para poder corroborar si Nur77 es un blanco de SUMO y el efecto de dicha modificación postraduccional, es necesario identificar los sitios sumoilados. Con este fin, en el presente trabajo se generaron mutantes en sitios predichos de sumoilación (Zárraga, 2008), que se muestran en la **Figura 22**.

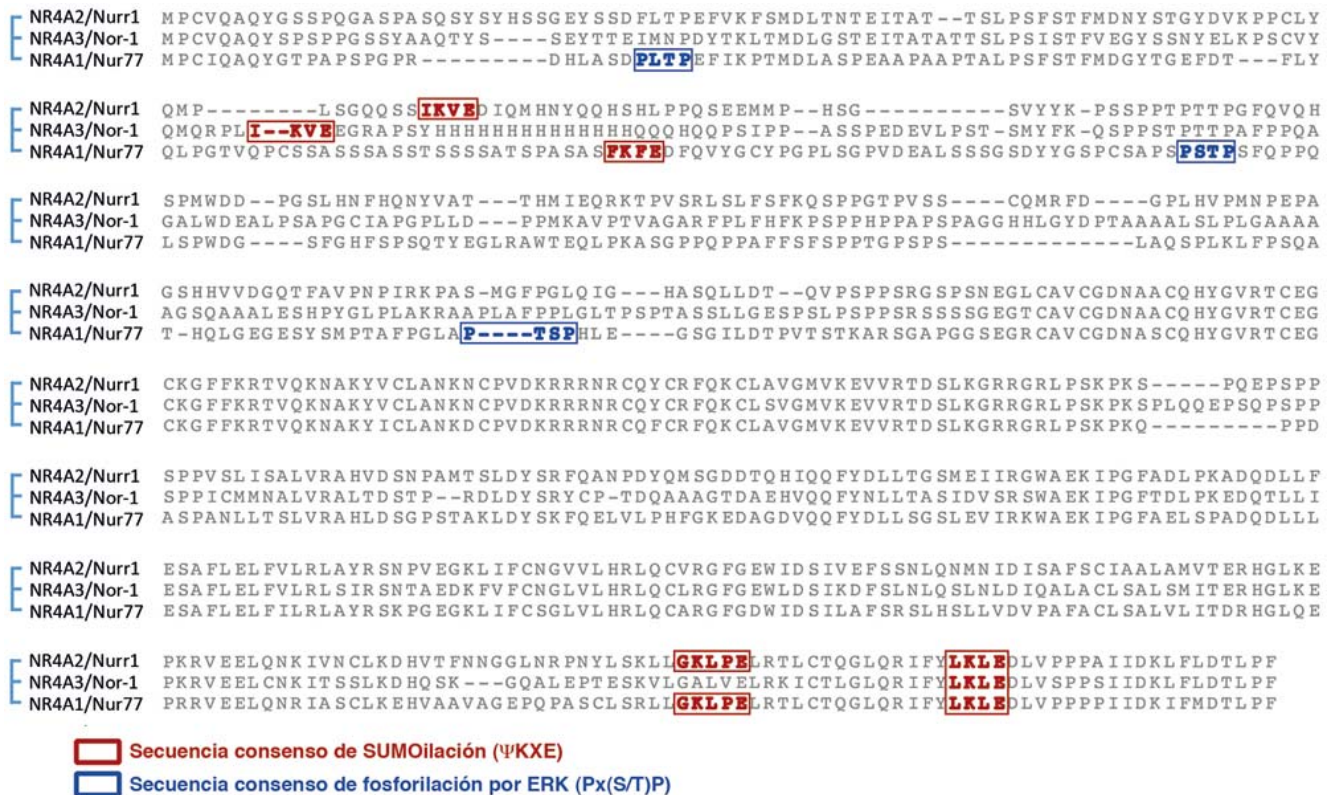


Figura 22. Sitios consenso de sumoilación y fosforilación por ERK en Nur77. Alineamiento, mediante Geneious™, de la subfamilia NR4A donde se muestran posibles sitios de sumoilación, indicados en recuadros rojos, y de fosforilación por ERK, en recuadros azules. Números de acceso NCBI: Nurr1: NP_006177.1, Nor-1: NP_008912.2 y Nur77: NP_002126.2.

La adición de un epítipo sintético facilita la purificación de proteínas y la diferenciación entre proteínas mutantes y endógenas, por ello se insertó el epítipo FLAG al extremo N-terminal de Nur77 (**Figura 23**). En el diseño de oligonucleótidos complementarios para la generación de FLAG-Nur77, se consideró el uso de codones adecuado para que dentro de la secuencia de FLAG se generará un sitio de restricción para la endonucleasa *PsiI*. De esta manera se puede identificar la inserción del epítipo mediante un análisis del patrón de restricción. La secuencia de los oligonucleótidos se encuentra en la sección de Materiales y Métodos, trabajo realizado por

Xicoténcatl Gracida. La digestión de pcDNA3.1-FLAG-Nur77 con *PsiI* generó tres fragmentos (3240 pb., 2519 pb. 1467 pb.), como se puede observar en la **Figura 23A**, mientras que la digestión de la construcción pcDNA3.1-Nur77 dio lugar solamente a dos fragmentos (5733 pb. y 1467 pb.). Se verificó por secuenciación (**Figura 23C**) y se comprobó la expresión correcta por western blot revelando tanto con un anticuerpo contra Nur77 como contra FLAG (**Figura 23D**).

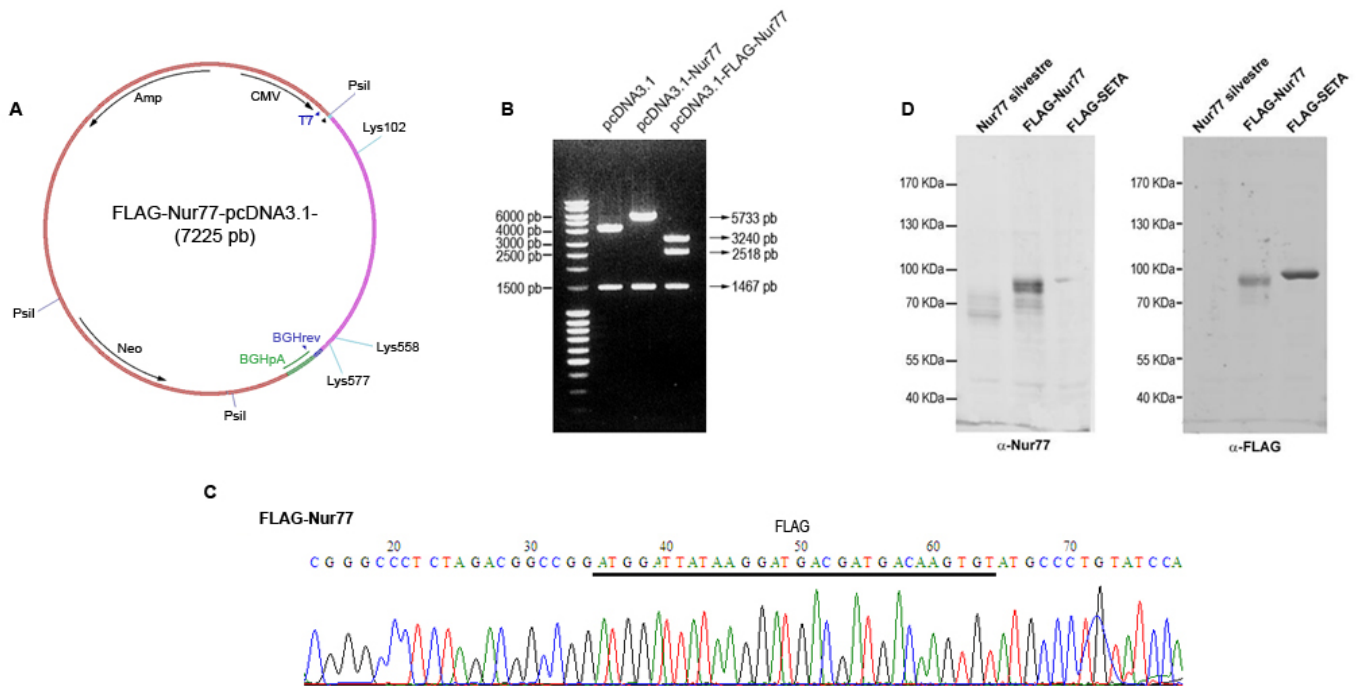


Figura 23. Inserción en el extremo N-terminal del epítipo FLAG a Nur77. **A**, mapa de la construcción FLAG-Nur77-pcDNA3.1. Se señalan los sitios de reconocimiento por la enzima endonucleasa *PsiI*, así como los residuos predichos como blanco de sumoilación para Nur77 (Lys102, Lys558 y Lys577). **B**, análisis del patrón de restricción con *PsiI* de los plásmidos indicados, el marcador de peso molecular se indica a la izquierda, mientras que el tamaño de los fragmentos obtenidos se indican a la derecha. **C**, cromatograma de la secuenciación de FLAG-Nur77. **D**, expresión de FLAG-Nur77, detectada con un anticuerpo contra Nur77 (panel izquierdo) o contra FLAG (panel derecho). Las proteínas totales fueron obtenidas de células previamente transfectadas con la construcción indicada para cada caso. El análisis se realizó por western blot.

Nur77 es una proteína con un peso aproximado de 65-77 KDa, por sus modificaciones postraduccionales. Como se observa en la **Figura 23D**, la inserción de FLAG incrementó su migración cerca de dos kilodaltones, dando lugar a una banda próxima a los 80 KDa. Es de notar que las bandas fueron menos definidas con anti-Nur77, además de que se aprecia un barrido entre los 70 y 90 KDa (**Figura 23D**), que corresponde tanto a la proteína endógena como a la proteína fusionada a FLAG. Como control de la especificidad de los anticuerpos, se incluyó como control positivo de la detección de FLAG, así como control negativo de la detección de Nur77, una construcción que codifica para una proteína irrelevante (la proteína de andamiaje SETA) fusionada a FLAG.

2. Generación de proteínas mutantes de Nur77 posiblemente no sumoilables.

La sustitución de lisinas por argininas, se ha usado ampliamente para identificar los residuos que son sumoilados, debido a la similitud de sus cargas (Babic *et al.*, 2006, Bohren *et al.*, 2004). Nur77 tiene numerosas lisinas dentro de su estructura primaria, de las cuales sólo dos cumplen con la secuencia consenso estricta para la sumoilación (Ψ KXE), la Lys102 y la Lys577. Recientemente, se describió la sumoilación *in vitro* de Nur1 por SUMO-2 y SUMO-3, en las Lys558 y Lys576, de los cuales la Lys558 es el principal sitio (Saijo *et al.*, 2009) y se encuentra conservada en Nur77, por lo que también podría ser un sitio de sumoilación para Nur77. Por lo anterior, se llevaron a cabo mutaciones sitio-dirigidas para generar las proteínas mutantes K102R, K558R y K577R, usando como templado la construcción FLAG-Nur77. Para descartar la posibilidad de que hubiera varios sitios de sumoilación, se generó una mutante doble (K102R,K577R) y una mutante triple (K102R,K558R,K577R).

En todos los casos, se comprobó la sustitución deseada por secuenciación y posteriormente se comprobó la expresión de las distintas proteínas mutadas por análisis tipo western blot (Figura 24). Todas las mutantes se expresan correctamente, aunque parece haber una menor abundancia de la triple mutante.

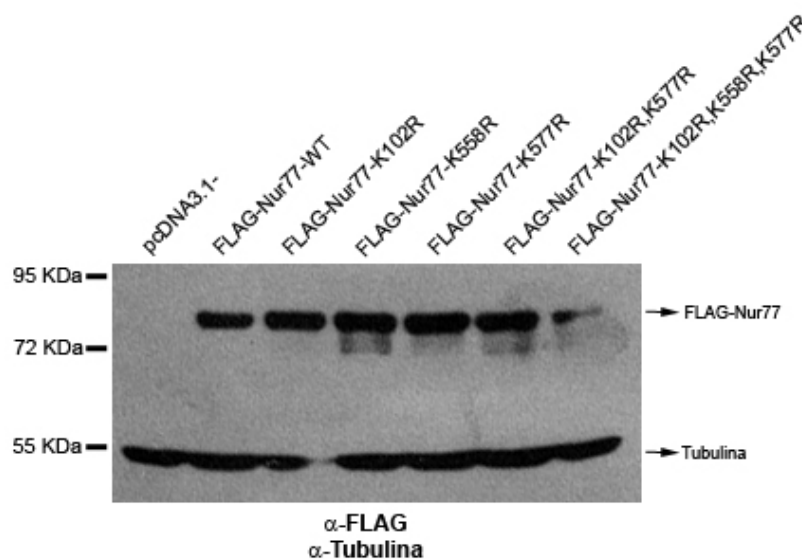


Figura 24. Expresión de mutantes de Nur77 en sitios predichos de sumoilación. western blot para detectar a FLAG-Nur77 silvestre y las diferentes proteínas mutantes, con un anticuerpo contra FLAG. Las proteínas totales fueron obtenidas de células previamente transfectadas con la construcción indicada. La detección de la proteína Tubulina se utilizó como control de carga.

3. Generación de proteínas mutantes de Nur77 en la Thr143.

En la muerte inducida por SP/NK₁R, Nur77 es fosforilado por ERK2 en una treonina (Castro-Obregon *et al.*, 2004). Para conocer los residuos en Nur77 que cumplen con la secuencia consenso de fosforilación por ERK, se buscó la secuencia consenso P-X-S/T-P (Slagsvold *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2007) dentro de Nur77 y se identificaron la Thr27, la Th143 y la Ser237 (**Figura 25**). De estos residuos, se ha reportado que el equivalente de la Thr143 en ratón, Th142, se fosforila específicamente por ERK2 y no por ERK1 (Slagsvold *et al.*, 2002), lo que sugiere a la Thr143 como residuo blanco de fosforilación, durante la muerte autofágica.

Para probar si la Thr143 es el sitio de fosforilación durante la muerte autofágica, y poder estudiar el efecto biológico de dicha fosforilación, se sustituyó dicha treonina ya sea por alanina (T143A) o por ácido aspártico (T143D), usando la construcción FLAG-Nur77 como templado. La hipótesis es que la sustitución de la treonina por alanina inhibirá la fosforilación, mientras que el ácido aspártico simulará la presencia del grupo fosfato debido a su carga negativa. La secuenciación de las construcciones probó la correcta sustitución de la treonina por alanina o ácido aspártico, según el caso. La expresión correcta de las proteínas se demostró por análisis tipo western blot (**Figura 25**).

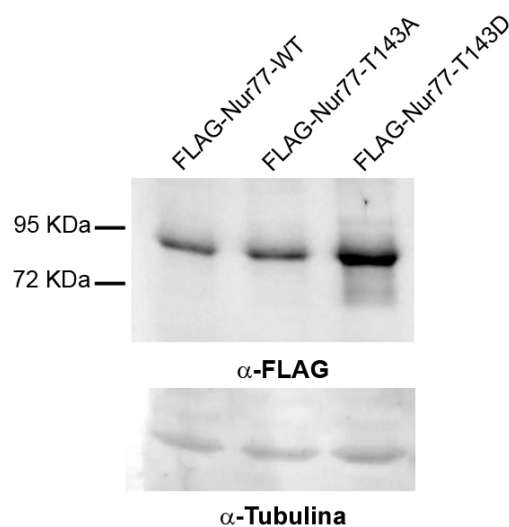


Figura 25. Expresión de las mutantes en la Thr143 de Nur77. Detección de la expresión de las mutantes FLAG-Nur77-T143A y FLAG-Nur77-T143D, con un anticuerpo contra el epítipo FLAG. Las proteínas totales fueron obtenidas de células previamente transfectadas con la construcción indicada para cada caso. El análisis se realizó por western blot y la detección de la proteína Tubulina se utilizó como control de carga.

El nivel de expresión de la mutante T143A fue similar al de la proteína silvestre (**Figura 25**); sin embargo, en el caso de la mutante T143D se aprecia un incremento de la cantidad de proteína, además se observó un ligero barrido debajo del peso molecular esperado (**Figura 25**). Esto sugiere que la presencia del residuo con carga negativa podría favorecer la estabilidad de la proteína.

E. La actividad transcripcional de Nur77 parece inhibirse por sumoilación y fosforilación.

La sumoilación es un mecanismo común para inhibir la actividad transcripcional de varios factores de transcripción. Para determinar si las modificaciones por sumoilación o fosforilación de Nur77, aquí predichas, podrían tener un efecto en su actividad transcripcional, se comparó la actividad transcripcional de Nur77 silvestre y de las proteínas mutantes K577R, K102R,K577R o bien, T143A y T143D. Se cotransfectaron células con tres plásmidos: 1) un plásmido reportero de la actividad transcripcional de Nur77, que consta de la secuencia codificante para luciferasa, bajo el control de un promotor mínimo con tres repeticiones del elemento de respuesta NBRE, al cual se une Nur77 monómero; 2) una construcción que codifica para la proteína β -galactosidasa bajo un promotor constitutivo (promotor CMV), que permitió normalizar los datos obtenidos de acuerdo a la eficiencia de la transfección; 3) las diferentes construcciones de Nur77 indicada para cada caso (**Figura 26**).

Como se puede ver en la **Figura 26**, la expresión de Nur77 silvestre indujo la actividad de luciferasa al unirse a la secuencia NBRE. La expresión de la doble mutante (K102R,K577R) indujo una mayor actividad de luciferasa respecto a Nur77 silvestre, lo cual fue estadísticamente significativo (**Figura 26A**). Dado que ese efecto no se observa con la mutante sencilla K577R, estos resultados sugieren que la Lys102 tiene un papel regulador sobre la actividad transcripcional de Nur77.

En cuanto a la fosforilación, la mutante T143A que elimina la posibilidad de ser fosforilada, tuvo una actividad transcripcional mayor. Ese efecto se perdió al reintroducir una carga negativa (T143D) emulando el efecto de la fosforilación (**Figura 26B**). La actividad transcripcional de las mutantes K102R, K558R y K102R,K558R,K577R no se probó en este trabajo.

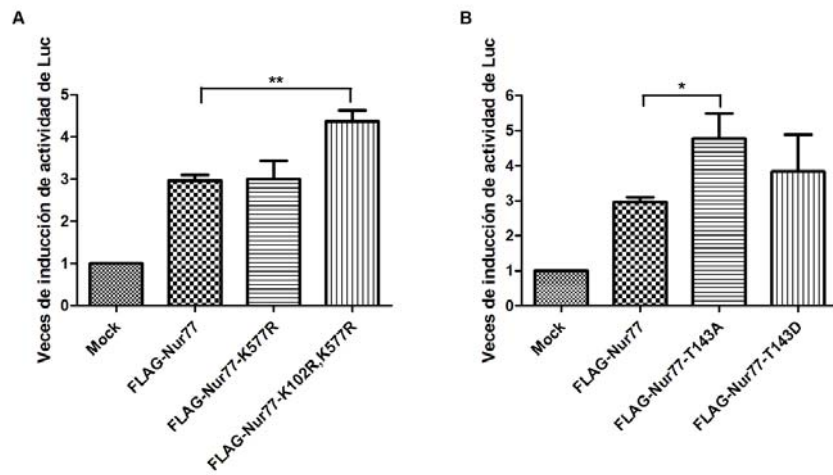


Figura 26. La eliminación de sitios potenciales de sumoilación y fosforilación aumentan la actividad transcripcional Nur77. Ensayos de actividad de transcripcional de proteínas mutadas en residuos predichos para **A**, la sumoilación, o **B**, la fosforilación de Nur77. Las células fueron previamente cotransfectadas con la construcción indicada más el reportero NBRE-3X-Luc y una construcción que expresa la proteína β -galactosidasa. Se grafica las veces de inducción de actividad de luciferasa respecto a un vector que contiene un promotor mínimo pero carece de los elementos de respuesta a Nur77. Las barras representan la desviación estándar y las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por un análisis de t Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n=3$.

XI. DISCUSIÓN:

A. La muerte autofágica mediada por Nur77 se lleva a cabo por la vía canónica, dependiente de Atg7 y Beclina-1.

Hasta la fecha se han reportado alrededor de 30 proteínas Atg (revisado en Funderburk *et al.*, 2010); sin embargo, las proteínas consideradas como clave para la autofagia forman un grupo más reducido. En la vía canónica de la autofagia, la presencia de Atg7 y Beclina-1 es necesaria para la formación de autofagosomas (Takacs-Vellai *et al.*, 2005, Xue *et al.*, 2010). Puesto que el proceso de autofagia en general favorece la sobrevivencia, era necesario distinguir si el incremento en características autofágicas previamente observado se debía a un intento de la célula por sobrevivir, o bien es parte del mecanismo de muerte. Por lo tanto, el haber observado que la muerte inducida por SP/NK₁R o IGF1R resultó inhibida al interferir con proteínas centrales de la autofagia tales como Atg7 o Beclina-1 (**Figura 14**), permite concluir que la formación de autofagosomas es necesaria para la muerte, y por lo tanto se puede decir que es una muerte autofágica. Esto es distinto a lo que ocurre por ejemplo en células HeLa tratadas con estaurosporina, en las que la disminución de Beclina-1 reduce los niveles de autofagia pero incrementa la muerte apoptótica (Zhu *et al.*, 2010). Además, el efecto observado con siAtg7 y siBeclina-1 sugiere que la autofagia inducida por SP/NK₁R o IGF1R es ejecutada a través de la vía canónica y no mediante vías alternativas, como recientemente se ha descrito, en las cuales se puede prescindir de Atg7 (Nishida *et al.*, 2009) o Beclina-1 (Tian *et al.*, 2010).

B. La inactivación de Nur77 disminuye la cantidad de LC3 en la muerte inducida por IGF1R.

Al estudiar la autofagia, cuando se analizan los diferentes marcadores, existe el debate de que las diferencias observadas se deben a un incremento en la autofagia o son consecuencia del bloqueo de algún paso en el flujo autofágico, como podría ser la fusión autofagosoma-lisosoma o la degradación dentro de los autofagolisosomas (revisado en Gottlieb y Mentzer, 2010); por lo tanto, la adición de cloroquina, una base que evita la activación de las proteasas de los autofagolisosomas (revisado en Gottlieb y Mentzer, 2010, Iwai-Kanai *et al.*, 2008, Ohta *et al.*, 2010), es útil para analizar la continuidad o bloqueo del flujo autofágico.

El valor obtenido al determinación del cociente LC3-II/LC3-I es indicativo de la inducción o no de la autofagia, valores por debajo de 1 indican la predominancia de LC3-I sobre LC3-II; si el resultado es 1, indica la presencia de la misma cantidad de LC3-I y LC3-II, que puede interpretarse como inducción de la autofagia; finalmente, si el valor es superior a 1, indica la clara predominancia de LC3-II sobre LC3-I y por lo tanto la evidente inducción de la autofagia. En la **Figura 15B** observamos un aumento de la proporción LC3-II/LC3-I en presencia de cloroquina, lo que indica una acumulación de LC3-II debido al bloqueo de la degradación dentro de los autofagolisosomas. Dicho aumento de LC3-II fue mayor que el observado en presencia de IGF1R, lo que

sugiere que la acumulación de LC3-II y vesículas autofágicas en la muerte autofágica mediada por Nur77, previamente reportado por el grupo, se debe a la inducción de la autofagia y no al bloqueo del flujo autofágico. Sin embargo, en el presente trabajo no se observó una acumulación significativa de LC3-II durante la muerte inducida por IGF1R. Es necesario hacer este mismo análisis con el modelo de muerte inducida por NK₁R/SP, ya que en éste colegas observaron un aumento mucho mayor que con IGF1R, como se puede ver en la **Figura 27**.

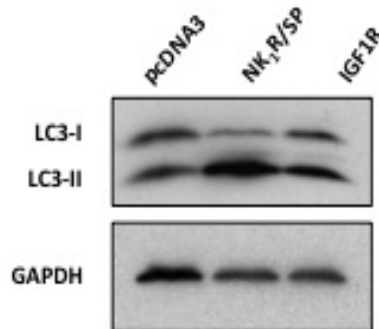


Figura 27. Aumenta la proporción de LC3-II durante la muerte inducida por NK₁R/SP y sólo modestamente por IGF1R. Western blot para detectar las proteínas indicadas, a las 24 horas de inducir la muerte celular con los estímulos indicados (trabajo realizado por Karen Poksay, del Buck Institute for Age Research, Novato, CA).

C. Distintos inhibidores generales de la sumoilación tienen efectos diferentes.

En estudios previos habíamos observado una sumoilación de Nur77 durante la muerte autofágica (**Figura 12**), por lo que en este trabajo analizamos si la sumoilación es necesaria para que se progrese la muerte autofágica. Como herramienta utilizamos a la proteína viral Gam1, que inhibe la sumoilación (Boggio *et al.*, 2004, Boggio *et al.*, 2007, Tago *et al.*, 2005). La expresión de Gam1 causó una disminución de Ubc9 desde las 24 horas (**Figura 16B**) como reportaron Tago *et al.*, (2005) y Wu *et al.* (2007). Similar a lo observado por Colombo *et al.*, (2002) y Boggio *et al.*, (2004), observamos una disminución de conjugados a SUMO, aunque en nuestro caso dichas diferencias se apreciaron con SUMO-2/-3 y no fueron claras con SUMO-1, salvo en bandas particulares (**Figura 16**). Al inmunoprecipitar a Nur77 en las condiciones de muerte autofágica y detectar la presencia de SUMO-1 y SUMO-2/-3, hubo preferencia por la interacción con SUMO-2/-3 (datos no mostrados); lo anterior y la observación del aumento en la sumoilación global de SUMO-2/-3 al estimular con SP (**Figura 16D**), sugiere la formación preferente de conjugados a SUMO-2/-3 en la muerte por SP/NK₁R. En apoyo nuestra hipótesis, observamos una disminución de la muerte autofágica en presencia de Gam1 (**Figura 17**). Sin embargo, falta determinar si la sumoilación de Nur77 en particular es necesaria para que progrese la muerte autofágica.

Para confirmar el papel de la sumoilación para la muerte autofágica, se buscó inhibir la función de Ubc9. La sustitución de la cisteína 93 por serina o alanina evita la formación del enlace tioester con SUMO y por lo tanto no hay interacción ni conjugación del péptido, aunque la capacidad de la proteína E2 para interactuar con las proteínas blanco no se altera (Gong *et al.*, 1997, Nowak y Hammerschmidt, 2006). Siguiendo la hipótesis de la

importancia de la sumoilación para la muerte autofágica, supusimos que Ubc9-C93S tendría un efecto similar a Gam1: disminuir la muerte. En cambio, al sobreexpresar Ubc9 silvestre podría incrementar la muerte o al menos no disminuirla, pues Nowak y Hammerschmidt (2006) muestran que en el caso del pez cebra la sobreexpresión de Ubc9 no tiene efecto. Sin embargo, los resultados fueron totalmente inesperados, la expresión de Ubc9-C93S no disminuyó la muerte autofágica, mientras que la sobreexpresión de la proteína silvestre la inhibió significativamente (**Figura 20**).

Es importante considerar que tanto Gam1 como Ubc9 podrían tener funciones alternativas a la sumoilación. Inicialmente, Gam1 fue descrita como una proteína antiapoptótica en cultivos primarios (Chiocca *et al.*, 1997), aunque posteriormente se observó el efecto opuesto en líneas celulares transformadas, donde incrementaba la sensibilidad a compuestos citotóxicos (Wu *et al.*, 2007). Las células empleadas en este trabajo fueron HEK293T, células transformadas, se comportaron de manera más similar a los fibroblastos, pues en presencia de Gam1 se inhibió la muerte celular (**Figura 17**).

Gam1 podría estar activando la transcripción de genes que inhiban la autofagia, ya que se ha descrito que su expresión activa diferentes promotores, aparentemente al interactuar con desacetilasas de histonas (HDACs, por sus siglas en inglés) de la clase I e inactivarlas, lo cual no está claramente asociado con la sumoilación, pues la eliminación de los sitios de sumoilación en HDAC1 no inactiva a la desacetilasa (Colombo *et al.*, 2002, Chiocca *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2007).

Otra función que podría tener Gam1 es la de favorecer interacciones proteína-proteína, debido a las múltiples leucinas que la constituyen. Similar a lo que hace con SAE1 (Boggio *et al.*, 2004, Boggio *et al.*, 2007, Chiocca *et al.*, 1997), podría favorecer la ubiquitinación o secuestrar alguna proteína que participe en la autofagia. Por otra parte, considerando las semejanzas bioquímicas entre el mecanismo de conjugación de SUMO y el mecanismo de conjugación de los sistemas tipo ubiquitina de la autofagia, Gam1 podría inhibir la función de la E1 de autofagia, la proteína Atg7. Aunque es interesante la biología de Gam1, no es un objetivo de este trabajo encontrar el mecanismo por el cual Gam1 disminuyó la muerte autofágica.

Por su parte, también Ubc9 favorece la sobrevivencia en ciertas condiciones. Por ejemplo, Ubc9 es importante para la inducción de la recombinación homóloga inducida por daño genotóxico en *S. cerevisiae* (Maeda *et al.*, 2004). Participa en el inicio de la mitosis (Nowak y Hammerschmidt, 2006), y se sobre-expresa en tumores de seno, pulmón, linfomas, etc.; participa en la invasión y metástasis tumoral, donde puede actuar de manera dependiente o independiente de la sumoilación (Wu *et al.*, 2009, Zhu *et al.*, 2009). Posiblemente su relación con el cáncer tenga que ver con el efecto de Ubc9-WT en la protección de la muerte celular autofágica que nosotros observamos.

De manera interesante, Ubc9 interactúa y regula positiva o negativamente la actividad transcripcional de receptores nucleares (Kobayashi *et al.*, 2004, Poukka *et al.*, 1999). En este contexto, es interesante la reciente observación de que Ubc9 silvestre interactúa con Nur77 durante la muerte autofágica, mientras que la mutante Ubc9-C93S pierde esa interacción (observación de la Dra. M. Rayo Sánchez). Es posible, entonces, que el efecto protector de la sobre-expresión Ubc9 se deba simplemente a que secuestra a Nur77.

D. Análisis de las proteínas mutantes de Nur77 potencialmente no sumoilables.

A partir de la sumoilación observada de Nur77 observada previamente, se decidió identificar el o los sitios blanco, en este trabajo se generaron las mutantes K102R, K558R, K577R, K102R,K577R y K102R,K558R,K577R (Figura 24). Para poder distinguir las proteínas mutantes de la endógena silvestre, previamente se incorporó la secuencia FLAG. Para interpretar los resultados, valdrá la pena considerar el papel estructural de las lisinas sustituidas en este trabajo. Hasta el momento, no hay alguna descripción de la importancia para la estructura terciaria de la proteína de alguna de la lisinas sustituidas, a pesar de que ya fue liberada la estructura cristalográfica del dominio de unión a ligando (LDB) de Nur77 en el Protein Data Bank (PDB) (Zhan *et al.*, 2008). Sin embargo, en el caso de Nur1, la Lys577 forma un puente salino que estabiliza su estructura, al permitir la interacción de dos hélices α (Wang *et al.*, 2003). El papel de la lisina 577 parece no ser fundamental en la estabilidad de Nur77, ya que se expresó con una abundancia comparable a la silvestre (Figura 24). El efecto estabilizador por sumoilación, al competir con la ubiquitinación, podría estudiarse al expresar las diferentes mutantes en presencia de algún inhibidor de la síntesis de síntesis de proteína a distintos tiempos.

Además de la estabilización de proteínas, la sumoilación ha sido implicada en múltiples procesos, entre los cuales está la regulación transcripcional, siendo inhibitoria en la mayoría de los casos (revisado en Babic *et al.*, 2006, Degerny *et al.*, 2005, Verger *et al.*, 2003). Nur77 es un factor de transcripción que está activo a las 6 horas posteriores del estímulo con SP (observación de la Dra. Rocío Rodríguez). En este trabajo se realizaron ensayos para comparar la actividad transcripcional de las diferentes mutantes respecto a la silvestre (Figura 26). Mientras que la actividad de K577R no presenta diferencias significativas con respecto a la proteína silvestre (Figura 26). Aparentemente, la sumoilación de Nur77 en la Lys102 podría ser inhibitoria sobre su actividad transcripcional, coincidente con lo que se ha reportado para otros factores de transcripción, en los cuales la sumoilación regula negativamente su actividad transcripcional.

También sería interesante conocer qué ocurre con la actividad transcripcional ante el elemento de respuesta que permita la homo o heterodimerización de Nur77, como es NurRE; ya que en Nur1 se observó que hay una disminución en la actividad transcripcional de las mutantes no sumoilables ante el elemento de respuesta NBRE, pero de forma opuesta hay una mayor actividad de las mutantes ante el elemento DR5 (Saijo *et al.*, 2009).

E. Identificación del sitio de fosforilación de Nur77 durante la muerte autofágica.

Castro-Obregón *et al.*, (2004) probaron que a las 3 horas de inducir muerte con SP, Nur77 es más abundante y se encuentra fosforilada en una treonina, pero no se identificó el sitio en el que es fosforilado por ERK2. Para conocer la treonina a la que se conjuga el grupo fosfato, se identificaron los residuos que cumplieran con el motivo consenso P-X-S/T-P, para la fosforilación por ERK y se generaron proteínas mutantes en la treonina 143 (**Figura 25**); la sustitución fue por ácido aspártico, para simular la fosforilación constitutiva, o por alanina, para evitar la fosforilación.

Al analizar la expresión de las mutantes T143A y T143D, se observó una expresión mayor de T143D, con respecto a la proteína silvestre (**Figura 25**), posiblemente la simulación de la carga negativa que confiere el ácido aspártico estabilice y permita la acumulación de la proteína. En la búsqueda de los sitios consenso de fosforilación también encontramos a la Thr27 y la Ser237 (**Figura 22**), que podrían ser analizados posteriormente, de acuerdo a los resultados obtenidos en presencia de la Thr143.

Al analizar la actividad transcripcional de las mutantes T143A y T143D, se encontró que la mutante T143A es más activa transcripcionalmente que la proteína silvestre e incluso que la mutante T143D (**Figura 26B**); esto sugiere que la fosforilación podría inhibir la actividad transcripcional dependiente de Nur77, ya que al eliminar la carga negativa, ya sea del fosfato o del ácido aspártico, es más activa.

$\Psi KxExxSP$ es una secuencia consenso para identificar moléculas blanco en las que pudiera haber una relación entre la fosforilación y la sumoilación. Son varios los ejemplos en los que la sumoilación y la fosforilación se dan en residuos contiguos (revisado en Yang y Gregoire, 2006), en el caso de Nur77, la Thr143 se encuentra a una distancia considerable de las diferentes lisinas propuestas como blanco de sumoilación; sin embargo, podría no ser un impedimento para se dé una interacción entre ambas modificaciones, ya que la distancia entre los aminoácidos podría disminuir cuando la proteína adquiere su estructura terciaria.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que tanto la sumoilación como la fosforilación son represores de la transcripcional dependiente de Nur77 y debido a que el efecto de ambas modificaciones va en el mismo sentido, posiblemente la presencia de alguna de ellas sea requisito para que ocurra la siguiente. Existen diferentes casos en los que la fosforilación previa favorece la sumoilación (revisado en Yang y Gregoire, 2006), quizá esto podría estar ocurriendo en Nur77. Aunque la relación entre la fosforilación y la sumoilación no

necesariamente es positiva entre ellas, pues existen ejemplos en los que pueden ser mutuamente excluyentes y la fosforilación impide la sumoilación de la molécula blanco.

Queda pendiente demostrar que efectivamente encontramos los sitios de sumoilación y fosforilación. De confirmarse, lo interesante será estudiar el papel biológico de esas modificaciones durante la muerte autofágica. Para esto, será necesario silenciar la proteína endógena para que no enmascare el efecto de la expresión de las mutantes. Una estrategia experimental será silenciar específicamente a Nur77 endógeno, con el empleo de siRNAs para Nur77 dirigidos a la región 3'-UTR que se encuentra ausente en los transgenes.

XII. CONCLUSIONES:

1. La muerte autofágica mediada por Nur77 se inhibió en ausencia de Atg7 y Beclina-1, por lo que se puede denominar muerte autofágica.
2. En la muerte por IGF1R, el flujo autofágico es continuo, por lo que el aumento de autofagosomas no se debe a una interrupción del flujo de la autofagia
3. La presencia de la proteína viral Gam1, disminuyó la muerte inducida por SP/NK₁R.
4. La presencia de la mutante inactiva de Ubc9, C93S, no disminuyó la muerte, mientras que la proteína silvestre sí.
5. Las mutantes K102R,K577R y T143A aumentan la actividad transcripcional de Nur77 respecto a la silvestre ante el elemento de respuesta NBRE.

XIII. PERSPECTIVAS:

1. Analizar la modificación de LC3-I a LC3-II en presencia de la DN de Nur77 en el modelo de muerte inducida por SP/NK₁R.
2. Determinar si se alteró la sumoilación y/o la fosforilación en las mutantes generadas.
3. Estudiar un posible switch fosfo-SUMO en Nur77 en la muerte autofágica.
4. Analizar la actividad transcripcional de las mutantes K102R, K558R, y K102R,K558R,K577R.
5. Comparar la estabilidad y localización intracelular de las diferentes mutantes.
6. Estudiar el papel de la sumoilación y/o fosforilación de Nur77 en la progresión de la muerte celular autofágica.

XIV. APÉNDICE I: Soluciones

A. Microbiología

1. Crecimiento bacteriano

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 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 queme.

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 µg/ml, disuelta en agua.

Aún frente al mechero, verter el medio con antibiótico dentro de cajas bacteriológicas, cubriendo aproximadamente de ½ 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.

B. Biología Molecular

1. Mutagénesis sitio-dirigida

Buffer de reacción 10x

- KCl 100 mM.
- (NH₄)₂SO₄ 100 mM.
- Tris-HCl 200 mM pH 8.8.
- MgSO₄ 20 mM.

Tritón X-100 1%.

BSA 1 $\mu\text{g/ml}$.

Medio NZY+ (10 ml):

100 mg de amina NZ (caseína hidrolizada).

50 mg de extracto de levadura.

50 mg de NaCl.

Agregar 9.5 ml de agua doble destilada.

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH.

Aforar a 10 ml.

Esterilizar por autoclave.

Antes de usar, agregar:

250 μl de MgCl_2 2 M (para preparación ver soluciones de microbiología).

100 μl de glucosa 2 M (para preparación ver soluciones de microbiología).

Acetato de sodio 3 M, pH 5.2 (10 ml):

2.472 g de acetato de sodio anhídrido.

Disolver en 9 ml de agua grado Biología Molecular.

Ajustar el pH a 5.2 con HCl y aforar a 10 ml.

X-gal 2%

Se usan 100 ml por caja

IPTG 100 mM

Se usan 100 ml por caja

2. Western blot

Buffer salino de fosfatos (PBS) 10 X (1 L):

NaCl 136 mM (80 g).

KCl 2 mM (2 g).

Na_2HPO_4 10 mM (14.4 g).

KH_2PO_4 1mM (2.4 g).

Disolver en 900 ml de agua bidestilada y aforar a 1 litro.

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

Almacenar a temperatura ambiente

La dilución de trabajo es 1X

Buffer de lisis para western blot (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 μl)

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).

Para detección de proteínas fosforiladas, agregar una pastilla inhibidora de fosfatasas por cada 10 ml de buffer (PhosSTOP; Roche # 04 906 837 001).

Para el análisis de proteínas sumoiladas, agregar N-etilmaleimida (NEM) 20 mM final.

N-etilmaleimida (NEM) 2M (Sigma-Aldrich # E3876)

Disolver en etanol, en solución acuosa es menos estable.

Almacenar a -20° C en alícuotas.

Descongelar una sola vez.

La concentración final de trabajo es 20 mM

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.

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.

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 de carga para proteínas 2x (100 ml):

Tris-HCl 100 mM, pH 6.8 (1.211 g)

20% de glicerol (20 ml)

2% de SDS (2 g)

0.005% de azul de bromofenol (5 mg)

Disolver el Tris base en 60 ml de agua bidestilada

Ajustar el pH a 6.8 con HCl

Disolver el resto de los reactivos y aforar a 100 ml con agua bidestilada

Hacer alícuotas de 1.9 ml/tubo

Almacenar a 4° C

Se usa a 1x final.

Antes de usar, añadir 100 μ l de β -mercaptoetanol a cada alícuota, para obtener una concentración final de 100 mM.

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

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.
No es necesario ajustar el pH. Se ajusta al diluir a 1X.
Almacenar a 4° C.

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 del metanol.
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.
Para detección de proteínas fosforiladas, agregar NaF y Glicero-2-fosfato de sodio.

TBST/BSA 5% (10 ml):
1 ml TBS 10X
10 µl Tween 20
50 mg BSA
Aforar a 10 ml con agua bidestilada.
Para detección de proteínas fosforiladas, agregar NaF y Glicero-2-fosfato de sodio.

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.
Para detección de proteínas fosforiladas, agregar NaF y Glicero-2-fosfato de sodio.

PBS/Tween 0.2% (1 L):
100 ml PBS 10X
2 ml de Tween 20

Disolver en 900 ml de agua bidestilada y aforar a 1 litro.
Almacenar a temperatura ambiente.
Para detección de proteínas fosforiladas, agregar NaF y Glicero-2-fosfato de sodio.

PBS/Tween 0.2%/SDS 0.1 % (10 ml)

1 ml PBS 10X
20 μ l Tween 20
10 μ l SDS 10%
Diluir en 9 ml de agua bidestilada y aforar a 10 ml.
Almacenar a temperatura ambiente.

Fluoruro de sodio (NaF) 1 M.

Almacenar a -20° C en alícuotas.
Descongelar una sola vez.
La concentración final de trabajo es 10 mM

Glicero-2-fosfato de sodio 2 M.

Almacenar a -20° C en alícuotas
Descongelar una sola vez.
La concentración final de trabajo es 25 mM

Solución desnudante para remover anticuerpos (100 ml):

β -mercaptoetanol 100 mM (700 μ l)
SDS 2% (20 ml SDS 10%)
Tris-HCl 62.5 mM (12.5 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8)
Aforar con agua bidestilada.
Preparar al instante.

3. Ensayo de actividad transcripcional

MgCl₂ 1M (10 ml):

952 mg MgCl₂
Aforar a 10 ml con agua bidestilada

O-nitofenil-b-D-galactopiranosido (ONPG, Sigma-Aldrich # N-1127)

Buffer de fosfatos (100 ml)

1.576 g Na₂HPO₄
1.228 g Na₂PO₄
Disolver en 70 ml de agua bidestilada
Ajustar a pH 7.3
Aforar a 100 ml con agua bidestilada

Buffer β -galactosidasa (para 24 pozos)

10 μ l MgCl₂ 1M
39 μ l β -mercaptoetanol
50 μ l ONPG 13.3 mg/ml
4.9 μ l buffer de fosfatos.

Na₂CO₃ 1 M (10 ml)

1.059 g Na₂CO₃ Aforar a 10 ml con agua bidestilada.

C. Biología Celular

1. Crecimiento y mantenimiento celular.

D-MEM (Dubelco's Modified Eagle Medium) (1 L):

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

NaHCO₃ 44 mM (3.7 g)

Disolver el medio en 800 ml de agua grado cultivo, añadir el NaHCO₃ y ajustar el pH a 6.9 con HCl 6N.

Aforar a 1 litro y dentro de la campana de flujo laminar, esterilizar filtrando a través de una 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.

Dentro de la campana de flujo laminar, hacer alícuotas de 40 ml y almacenar a -20° C.

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

GPS 100X (Glutamina/Penicilina/Estreptomycin) (100 ml):

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

300 mg de penicilina

500 mg de estreptomycin

Agregar la penicilina y estreptomycin a 10 ml de Gluta-Max.

Aforar la mezcla a 100 ml con Gluta-Max.

Dentro de la campana de flujo laminar, esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 μm.

Mezclar y hacer alícuotas de 5 ml. Almacenar a -20° C.

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

Buffer salino de fosfatos (PBS) (1 L):

NaCl 136 mM (8 g)

KCl 2 mM (0.2 g)

Na₂HPO₄ 10 mM (1.44 g)

KH₂PO₄ 1mM (0.24 g)

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

Dentro de la campana de flujo laminar, esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 μm.

Almacenar a 4°C.

Tripsina 0.25% (10 ml):

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

9 ml de Verseno (GIBCO #15040-066)

Dentro de la campana de flujo laminar, 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)
Dentro de la campana de flujo laminar, mezclar y almacenar a 4° C hasta 1 mes.

Medio de congelación 2X (10 ml):

6 ml de medio D-MEM
2 ml de FBS (20% final)
2 ml de DMSO (Sigma-Aldrich #D2650) (20% final).

2. Transfección por CaCl₂

HBS 2X (100 ml):

NaCl 273 mM (1.6 g)
KCl 9.9 mM (0.074 g)
Na₂HPO₄ 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).

Dentro de la campana de flujo laminar, filtrar las soluciones a través de membrana de 0.22 µm.

Determinar el buffer con mejor eficiencia (mínimo 70%), al transfectar un vector de expresión de GFP, con soluciones a diferentes pH.

Hacer alícuotas de 500 µl del buffer que dé lugar a la mayor eficiencia de transfección y almacenarlo a -70° C.

CaCl₂ 2M (5 ml):

1.472 g CaCl₂

Aforar a 5 ml con agua grado cultivo.

Dentro de la campana de flujo laminar, filtrarlo a través de una membrana de 0.22 µm.

Hacer alícuotas de 500 µl.

Almacenar a -70° C.

3. Lipofección

Medio para lipofección (250 ml):

220 ml de medio D-MEM
25 ml de FBS (10% final)
2.5 ml 100 ml de Gluta-Max 200 mM (GIBCO #35050-061)
2.5 ml de piruvato de sodio (GIBCO #11360-070)

Dentro de la campana de flujo laminar, mezclar y almacenar a 4° C hasta 1 mes. Es importante hacer notar que no incluye antibióticos.

4. Viabilidad celular

Azul de tripano 10% (10 ml):

1ml de azul de tripano

Aforar con PBS y dentro de la campana de flujo laminar, filtrarlo a través de una membrana de 0.22 µm.

5. Muerte celular inducida por SP/NK₁R

Sustancia P (SP; Sigma-Aldrich #S6883)

Disolver todo el contenido en el volumen necesario de agua, grado cultivo, para conseguir la concentración de 100 µM.

Hacer alícuotas de 100 μ l e inmediatamente colocarlas en hielo seco.

Almacenar a -70°C.

La dilución de trabajo final es 100 nM

La SP es un compuesto muy inestable, que en solución acuosa tiene una vida media de 5 minutos aproximadamente, por lo que debe mantenerse en hielo desde su descongelamiento y durante toda su manipulación.

LY294002 50 mM (Sigma-Aldrich #L9908)(1 ml)

17.19 mg de LY294002

Aforar a 1 ml con DMSO

Cloroquina 25 mM (Sigma-Aldrich #C6628)

XV. REFERENCIAS:

1. Agbor, T. A. y Taylor, C. T. (2008) SUMO, hypoxia and the regulation of metabolism, *Biochem Soc Trans* 36, 445-448.
2. Babic, I., Cherry, E. y Fujita, D. J. (2006) SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis, *Oncogene* 25, 4955-4964.
3. Baehrecke, E. H. (2002) How death shapes life during development, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 779-787.
4. Bailey, D. y O'Hare, P. (2004) Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1, *J Biol Chem* 279, 692-703.
5. Baserga, R. (2000) The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor, *Oncogene* 19, 5574-5581.
6. Beg, A. A. y Scheiffele, P. (2006) Neuroscience. SUMO wrestles the synapse, *Science* 311, 962-963.
7. Berry, D. L. y Baehrecke, E. H. (2007) Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*, *Cell* 131, 1137-1148.
8. Boggio, R., Colombo, R., Hay, R. T., Draetta, G. F. y Chiocca, S. (2004) A mechanism for inhibiting the SUMO pathway, *Mol Cell* 16, 549-561.
9. Boggio, R., Passafaro, A. y Chiocca, S. (2007) Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation, *J Biol Chem* 282, 15376-15382.
10. Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H. y Owerbach, D. (2004) 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, *J Biol Chem* 279, 27233-27238.
11. Bonta, P. I., Pols, T. W. y de Vries, C. J. (2007) NR4A nuclear receptors in atherosclerosis and vein-graft disease, *Trends Cardiovasc Med* 17, 105-111.
12. Bouzas-Rodriguez, J. 2006. Caracterización del mecanismo molecular de un tipo de muerte celular no apoptótica. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Ciencias, UNAM, México. pp. 67
13. Castro-Obregon, S., Rao, R. V., del Rio, G., Chen, S. F., Poksay, K. S., Rabizadeh, S., Vesce, S., Zhang, X. K., Swanson, R. A. y Bredesen, D. E. (2004) Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77, *J Biol Chem* 279, 17543-17553.
14. Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G. F. y Chiocca, S. (2002) The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1, *EMBO Rep* 3, 1062-1068.
15. Chiocca, S., Baker, A. y Cotten, M. (1997) Identification of a novel antiapoptotic protein, GAM-1, encoded by the CELO adenovirus, *J Virol* 71, 3168-3177.
16. Chiocca, S., Kurtev, V., Colombo, R., Boggio, R., Scirpi, M. T., Brosch, G., Seiser, C., Draetta, G. F. y Cotten, M. (2002) Histone deacetylase 1 inactivation by an adenovirus early gene product, *Curr Biol* 12, 594-598.
17. Choi, I. K., Cho, Y. S., Jung, H. J. y Kwon, H. J. (2010) Autophagonizer, a novel synthetic small molecule, induces autophagic cell death, *Biochem Biophys Res Commun* 393, 849-854.
18. Dal Canto, M. C. y Gurney, M. E. (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis, *Am J Pathol* 145, 1271-1279.
19. Degerny, C., Monte, D., Beaudoin, C., Jaffray, E., Portois, L., Hay, R. T., de Launoit, Y. y Baert, J. L. (2005) SUMO modification of the Ets-related transcription factor ERM inhibits its transcriptional activity, *J Biol Chem* 280, 24330-24338.
20. Degtarev, A. y Yuan, J. (2008) Expansion and evolution of cell death programmes, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 378-390.
21. Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H. y Kumar, S. (2009) Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*, *Curr Biol* 19, 1741-1746.
22. Denuc, A. y Marfany, G. (2010) SUMO and ubiquitin paths converge, *Biochem Soc Trans* 38, 34-39.
23. Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. y Hay, R. T. (1998) SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation, *Mol Cell* 2, 233-239.

24. Dice, J. F. (2007) Chaperone-mediated autophagy, *Autophagy* 3, 295-299.
25. Dye, B. T. y Schulman, B. A. (2007) Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, 131-150.
26. Faus, H. y Haendler, B. (2006) Post-translational modifications of steroid receptors, *Biomed Pharmacother* 60, 520-528.
27. Fimia, G. M. y Piacentini, M. (2010) Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis, *Cell Mol Life Sci* 67, 1581-1588.
28. Fink, S. L. y Cookson, B. T. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, *Infect Immun* 73, 1907-1916.
29. Flaig, R., Greschik, H., Peluso-Ittis, C. y Moras, D. (2005) Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain, *J Biol Chem* 280, 19250-19258.
30. Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., Schneider, C. y Del Sal, G. (2000) Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform, *The EMBO journal* 19, 6185-6195.
31. Fujii, Y., Matsuda, S., Takayama, G. y Koyasu, S. (2008) ERK5 is involved in TCR-induced apoptosis through the modification of Nur77, *Genes Cells* 13, 411-419.
32. Funderburk, S. F., Wang, Q. J. y Yue, Z. (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond, *Trends Cell Biol* 20, 355-362.
33. Giguere, V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function, *Endocr Rev* 20, 689-725.
34. Gong, L., Kamitani, T., Fujise, K., Caskey, L. S. y Yeh, E. T. (1997) Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9, *J Biol Chem* 272, 28198-28201.
35. Gottlieb, R. A. y Mentzer, R. M. (2010) Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy, *Annu Rev Physiol* 72, 45-59.
36. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. y Mizushima, N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice, *Nature* 441, 885-889.
37. Hay, R. T. (2005) SUMO: a history of modification, *Mol Cell* 18, 1-12.
38. Hay, R. T. (2007) SUMO-specific proteases: a twist in the tail, *Trends Cell Biol* 17, 370-376.
39. Hazel, T. G., Nathans, D. y Lau, L. F. (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8444-8448.
40. He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., Pei, Y., Chen, Y., Ling, W., Wu, C., Zhao, S., Liu, J. O. y Yu, L. (2003) Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B, *J Biol Chem* 278, 29278-29287.
41. Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L. y Sistonen, L. (2003) Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1, *Mol Cell Biol* 23, 2953-2968.
42. Hongo, A., Yumet, G., Resnicoff, M., Romano, G., O'Connor, R. y Baserga, R. (1998) Inhibition of tumorigenesis and induction of apoptosis in human tumor cells by the stable expression of a myristylated COOH terminus of the insulin-like growth factor I receptor, *Cancer Res* 58, 2477-2484.
43. Hsu, H. C., Zhou, T. y Mountz, J. D. (2004) Nur77 family of nuclear hormone receptors, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3, 413-423.
44. Iwai-Kanai, E., Yuan, H., Huang, C., Sayen, M. R., Perry-Garza, C. N., Kim, L. y Gottlieb, R. A. (2008) A method to measure cardiac autophagic flux in vivo, *Autophagy* 4, 322-329.
45. Kadowaki, M. y Karim, M. R. (2009) Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy, *Methods Enzymol* 452, 199-213.
46. Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T. y Yeh, E. T. (1998) Identification of three major sentrinization sites in PML, *J Biol Chem* 273, 26675-26682.

47. Katagiri, Y., Hirata, Y., Milbrandt, J. y Guroff, G. (1997) Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor, *J Biol Chem* 272, 31278-31284.
48. Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Ozato, K. y Guroff, G. (2000) Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B, *Nat Cell Biol* 2, 435-440.
49. Kaushik, S. y Cuervo, A. M. (2009) Methods to monitor chaperone-mediated autophagy, *Methods Enzymol* 452, 297-324.
50. Ke, N., Claassen, G., Yu, D. H., Albers, A., Fan, W., Tan, P., Grifman, M., Hu, X., Defife, K., Nguy, V., Meyhack, B., Brachat, A., Wong-Staal, F. y Li, Q. X. (2004) Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis, *Cancer Res* 64, 8208-8212.
51. Kerscher, O. (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs, *EMBO Rep* 8, 550-555.
52. Kerscher, O., Felberbaum, R. y Hochstrasser, M. (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins, *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-180.
53. Kim, E. H., Sohn, S., Kwon, H. J., Kim, S. U., Kim, M. J., Lee, S. J. y Choi, K. S. (2007) Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells, *Cancer Res* 67, 6314-6324.
54. Kim, K. I., Baek, S. H. y Chung, C. H. (2002) Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function, *J Cell Physiol* 191, 257-268.
55. Kim, S. O., Ono, K., Tobias, P. S. y Han, J. (2003) Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death, *J Exp Med* 197, 1441-1452.
56. Klionsky, D. J., Cuervo, A. M., Dunn, W. A., Jr., Levine, B., van der Klei, I. y Seglen, P. O. (2007a) How shall I eat thee?, *Autophagy* 3, 413-416.
57. Klionsky, D. J., Cuervo, A. M. y Seglen, P. O. (2007b) Methods for monitoring autophagy from yeast to human, *Autophagy* 3, 181-206.
58. Kobayashi, S., Shibata, H., Kurihara, I., Yokota, K., Suda, N., Saito, I. y Saruta, T. (2004) Ubc9 interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I and represses receptor-dependent transcription, *J Mol Endocrinol* 32, 69-86.
59. Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K. y Uchiyama, Y. (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury, *Am J Pathol* 172, 454-469.
60. Kolluri, S. K., Bruey-Sedano, N., Cao, X., Lin, B., Lin, F., Han, Y. H., Dawson, M. I. y Zhang, X. K. (2003) Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells, *Mol Cell Biol* 23, 8651-8667.
61. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. y Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice, *Nature* 441, 880-884.
62. Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S. y Melino, G. (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1463-1467.
63. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. y Melino, G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ* 16, 3-11.

64. Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J. A., Reed, J. C. y Zhang, X. (2000) Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3, *Science* 289, 1159-1164.
65. Li, J. y Yuan, J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond, *Oncogene* 27, 6194-6206.
66. Liang, B., Song, X., Liu, G., Li, R., Xie, J., Xiao, L., Du, M., Zhang, Q., Xu, X., Gan, X. y Huang, D. (2007) Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis, *Exp Cell Res* 313, 2833-2844.
67. Loos, B. y Engelbrecht, A. M. (2009) Cell death: a dynamic response concept, *Autophagy* 5, 590-603.
68. Maeda, D., Seki, M., Onoda, F., Brnzei, D., Kawabe, Y. y Enomoto, T. (2004) Ubc9 is required for damage-tolerance and damage-induced interchromosomal homologous recombination in *S. cerevisiae*, *DNA Repair (Amst)* 3, 335-341.
69. Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. y Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2, *Cell* 88, 97-107.
70. Martin, S., Wilkinson, K. A., Nishimune, A. y Henley, J. M. (2007) Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction, *Nat Rev Neurosci* 8, 948-959.
71. Masuyama, N., Oishi, K., Mori, Y., Ueno, T., Takahama, Y. y Gotoh, Y. (2001) Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis, *J Biol Chem* 276, 32799-32805.
72. McEwan, D. G. y Dikic, I. (2010) Not all autophagy membranes are created equal, *Cell* 141, 564-566.
73. Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I. y Codogno, P. (2010) Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells, *Cell Res* 20, 748-762.
74. Meulmeester, E. y Melchior, F. (2008) Cell biology: SUMO, *Nature* 452, 709-711.
75. Mikolajczyk, J., Drag, M., Bekes, M., Cao, J. T., Ronai, Z. y Salvesen, G. S. (2007) Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-specific proteases: profiling the specificities and activities of human SENPs, *J Biol Chem* 282, 26217-26224.
76. Miura, K. y Hasegawa, P. M. (2010) Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants, *Trends Cell Biol* 20, 223-232.
77. Mizushima, N. y Yoshimori, T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting, *Autophagy* 3, 542-545.
78. Moll, U. M., Marchenko, N. y Zhang, X. K. (2006) p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction, *Oncogene* 25, 4725-4743.
79. Mukhopadhyay, D. y Dasso, M. (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases, *Trends Biochem Sci* 32, 286-295.
80. Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. y Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-210.
81. Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y. y Shimizu, S. (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy, *Nature* 461, 654-658.
82. Noda, T., Fujita, N. y Yoshimori, T. (2009) The late stages of autophagy: how does the end begin?, *Cell Death Differ* 16, 984-990.
83. Nowak, M. y Hammerschmidt, M. (2006) Ubc9 regulates mitosis and cell survival during zebrafish development, *Mol Biol Cell* 17, 5324-5336.
84. Ohta, K., Mizuno, A., Ueda, M., Li, S., Suzuki, Y., Hida, Y., Hayakawa-Yano, Y., Itoh, M., Ohta, E., Kobori, M. y Nakagawa, T. (2010) Autophagy impairment stimulates PS1 expression and gamma-secretase activity, *Autophagy* 6.
85. Okuma, T., Honda, R., Ichikawa, G., Tsumagari, N. y Yasuda, H. (1999) In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2, *Biochem Biophys Res Commun* 254, 693-698.
86. Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T., Gabbay, K. H. y Bohren, K. M. (2005) A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation, *Biochem Biophys Res Commun* 337, 517-520.

87. Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M. y Codogno, P. (2008) Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes, *Biochimie* 90, 313-323.
88. Pearen, M. A. y Muscat, G. E. (2010) Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease, *Mol Endocrinol*.
89. Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. y Melchior, F. (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity, *Cell* 108, 109-120.
90. Poukka, H., Aarnisalo, P., Karvonen, U., Palvimo, J. J. y Janne, O. A. (1999) Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor-dependent transcription, *J Biol Chem* 274, 19441-19446.
91. Rajpal, A., Cho, Y. A., Yelent, B., Koza-Taylor, P. H., Li, D., Chen, E., Whang, M., Kang, C., Turi, T. G. y Winoto, A. (2003) Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor, *EMBO J* 22, 6526-6536.
92. Saijo, K., Winner, B., Carson, C. T., Collier, J. G., Boyer, L., Rosenfeld, M. G., Gage, F. H. y Glass, C. K. (2009) A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death, *Cell* 137, 47-59.
93. Satoo, K., Noda, N. N., Kumeta, H., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y. y Inagaki, F. (2009) The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy, *EMBO J* 28, 1341-1350.
94. Scarlatti, F., Granata, R., Meijer, A. J. y Codogno, P. (2009) Does autophagy have a license to kill mammalian cells?, *Cell Death Differ* 16, 12-20.
95. Schmidt, D. y Muller, S. (2003) PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation, *Cell Mol Life Sci* 60, 2561-2574.
96. Schwarz, S. E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M. y Jentsch, S. (1998) The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 560-564.
97. Schweichel, J. U. y Merker, H. J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues, *Teratology* 7, 253-266.
98. Shen, T. H., Lin, H. K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M. y Pandolfi, P. P. (2006) The mechanisms of PML-nuclear body formation, *Mol Cell* 24, 331-339.
99. Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. y Tsujimoto, Y. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes, *Nat Cell Biol* 6, 1221-1228.
100. Slagsvold, H. H., Ostvold, A. C., Fallgren, A. B. y Paulsen, R. E. (2002) Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2, *Biochem Biophys Res Commun* 291, 1146-1150.
101. Sohn, S. J., Thompson, J. y Winoto, A. (2007) Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes, *Curr Opin Immunol* 19, 510-515.
102. Sperandio, S., de Belle, I. y Bredesen, D. E. (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14376-14381.
103. Sperandio, S., Poksay, K., de Belle, I., Lafuente, M. J., Liu, B., Nasir, J. y Bredesen, D. E. (2004) Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix, *Cell Death Differ* 11, 1066-1075.
104. Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L. C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y. Z., Cattaneo, E., Pandolfi, P. P., Thompson, L. M. y Marsh, J. L. (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology, *Science* 304, 100-104.
105. Suzuki, S., Suzuki, N., Mirtsos, C., Horacek, T., Lye, E., Noh, S. K., Ho, A., Bouchard, D., Mak, T. W. y Yeh, W. C. (2003) Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8276-8280.
106. Syntichaki, P. y Tavernarakis, N. (2003) The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?, *Nat Rev Neurosci* 4, 672-684.
107. Tago, K., Chiocca, S. y Sherr, C. J. (2005) Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7689-7694.

108. Takacs-Vellai, K., Vellai, T., Puoti, A., Passannante, M., Wicky, C., Streit, A., Kovacs, A. L. y Muller, F. (2005) Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*, *Curr Biol* 15, 1513-1517.
109. Tanida, I., Ueno, T. y Kominami, E. (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy, *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2503-2518.
110. Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H. y Hay, R. T. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9, *The Journal of biological chemistry* 276, 35368-35374.
111. Taylor, R. C., Cullen, S. P. y Martin, S. J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.
112. Tian, S., Lin, J., Jun Zhou, J., Wang, X., Li, Y., Ren, X., Yu, W., Zhong, W., Xiao, J., Sheng, F., Chen, Y., Jin, C., Li, S., Zheng, Z. y Xia, B. (2010) Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, *Z18, Autophagy* 6, 1032-1041.
113. Tsujimoto, Y. y Shimizu, S. (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death, *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1528-1534.
114. Turmaine, M., Raza, A., Mahal, A., Mangiarini, L., Bates, G. P. y Davies, S. W. (2000) Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8093-8097.
115. Verger, A., Perdomo, J. y Crossley, M. (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation, *EMBO Rep* 4, 137-142.
116. Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P. y Perlmann, T. (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors, *Nature* 423, 555-560.
117. Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V. y Elazar, Z. (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis, *EMBO J* 29, 1792-1802.
118. Wilkinson, K. A. y Henley, J. M. (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation, *Biochem J* 428, 133-145.
119. Winoto, A. y Littman, D. R. (2002) Nuclear hormone receptors in T lymphocytes, *Cell* 109 Suppl, S57-66.
120. Wu, F., Chiocca, S., Beck, W. T. y Mo, Y. Y. (2007) Gam1-associated alterations of drug responsiveness through activation of apoptosis, *Mol Cancer Ther* 6, 1823-1830.
121. Wu, F., Zhu, S., Ding, Y., Beck, W. T. y Mo, Y. Y. (2009) MicroRNA-mediated regulation of Ubc9 expression in cancer cells, *Clin Cancer Res* 15, 1550-1557.
122. Xie, Z. y Klionsky, D. J. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations, *Nat Cell Biol* 9, 1102-1109.
123. Xu, Y., Kim, S. O., Li, Y. y Han, J. (2006) Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death, *J Biol Chem* 281, 19179-19187.
124. Xue, L., Fletcher, G. C. y Tolkovsky, A. M. (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution, *Mol Cell Neurosci* 14, 180-198.
125. Xue, L. Y., Chiu, S. M. y Oleinick, N. L. (2010) Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy, *Autophagy* 6, 248-255.
126. Yamaguchi, T., Sharma, P., Athanasiou, M., Kumar, A., Yamada, S. y Kuehn, M. R. (2005) Mutation of SENP1/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development, *Mol Cell Biol* 25, 5171-5182.
127. Yang, X. J. y Gregoire, S. (2006) A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond, *Mol Cell* 23, 779-786.
128. Yokota, K., Shibata, H., Kurihara, I., Kobayashi, S., Suda, N., Murai-Takeda, A., Saito, I., Kitagawa, H., Kato, S., Saruta, T. y Itoh, H. (2007) Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9, *J Biol Chem* 282, 1998-2010.

129. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. y Heintz, N. (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15077-15082.
130. Zárraga, G. 2008. Modificaciones postraduccionales del receptor nuclear Nur77. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Ciencias, UNAM., México. pp. 94
131. Zeng, H., Qin, L., Zhao, D., Tan, X., Manseau, E. J., Van Hoang, M., Senger, D. R., Brown, L. F., Nagy, J. A. y Dvorak, H. F. (2006) Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity, *J Exp Med* 203, 719-729.
132. Zhan, Y., Du, X., Chen, H., Liu, J., Zhao, B., Huang, D., Li, G., Xu, Q., Zhang, M., Weimer, B. C., Chen, D., Cheng, Z., Zhang, L., Li, Q., Li, S., Zheng, Z., Song, S., Huang, Y., Ye, Z., Su, W., Lin, S. C., Shen, Y. y Wu, Q. (2008) Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77, *Nat Chem Biol* 4, 548-556.
133. Zhang, T., Jia, N., Fei, E., Wang, P., Liao, Z., Ding, L., Yan, M., Nukina, N., Zhou, J. y Wang, G. (2007) Nurr1 is phosphorylated by ERK2 in vitro and its phosphorylation upregulates tyrosine hydroxylase expression in SH-SY5Y cells, *Neurosci Lett* 423, 118-122.
134. Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A. y Pandolfi, P. P. (2000) Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation, *Blood* 95, 2748-2752.
135. Zhu, S., Sachdeva, M., Wu, F., Lu, Z. y Mo, Y. Y. (2009) Ubc9 promotes breast cell invasion and metastasis in a sumoylation-independent manner, *Oncogene*.
136. Zhu, Y., Zhao, L., Liu, L., Gao, P., Tian, W., Wang, X., Jin, H., Xu, H. y Chen, Q. (2010) Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis, *Protein Cell* 1, 468-477.