



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGULACIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR NR4A1
POR SUMOILACIÓN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA :

WENDY VILLAMIZAR GÁLVEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN
2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

APELLIDO PATERNO	VILLAMIZAR
APELLIDO MATERNO	GÁLVEZ
NOMBRE (S)	WENDY
TELÉFONO	56 72 46 63
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS	FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA	BIOLOGÍA
NÚMERO DE CUENTA	305695101

2. Datos del Tutor

GRADO	DRA.
NOMBRE (S)	SUSANA
APELLIDO PATERNO	CASTRO
APELLIDO MATERNO	OBREGÓN

3. Datos del Sinodal 1

GRADO	M. en C.
NOMBRE (S)	DIANA ELODIA
APELLIDO PATERNO	AGUILAR
APELLIDO MATERNO	LEÓN

4. Datos del Sinodal 2

GRADO
NOMBRE (S)
APELLIDO PATERNO
APELLIDO MATERNO

DR.
LUIS FERNANDO
COVARRUBIAS
ROBLES

5. Datos del Sinodal 3

GRADO
NOMBRE (S)
APELLIDO PATERNO
APELLIDO MATERNO

DR.
LUIS FELIPE
JIMÉNEZ
GARCÍA

6. Datos del Sinodal 4

GRADO
NOMBRE (S)
APELLIDO PATERNO
APELLIDO MATERNO

DRA.
MARIA DEL RAYO
SÁNCHEZ
CARBENTE

7. Datos del trabajo escrito

TÍTULO

REGULACIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR NR4A1
POR SUMOILACIÓN

NÚMERO DE PÁGINAS
AÑO

69 p
2014

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABREVIATURAS.....	2
III. INTRODUCCIÓN	3
EL RECEPTOR NUCLEAR NR4A1	3
FUNCIONES DE NR4A1.....	4
REGULACIÓN DE NR4A1	5
FOSFORILACIÓN DE NR4A1.....	6
SUMOILACIÓN	7
REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR SUMOILACIÓN	9
INHIBICIÓN DE LA SUMOILACIÓN.....	10
INTERACCIÓN DE SUMO CON OTRAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES.....	11
MUERTE CELULAR	12
AUTOFAGIA	13
IMPLICACIONES DE LA AUTOFAGIA	17
IV. ANTECEDENTES.....	20
MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA INDUCIDA POR NK1R/ SP.....	20
PARTICIPACIÓN DE NR4A1 DURANTE LA MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA INDUCIDA POR NK1R/SP .	21
LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE NR4A1	23
SUMOILACIÓN DE NR4A1.....	24
V. JUSTIFICACIÓN.....	26
VI. HIPÓTESIS.....	27
VII. OBJETIVO GENERAL	27
VIII. MÉTODOLÓGÍA EXPERIMENTAL.....	28
BIOLOGÍA CELULAR.....	28
A. Cultivo Celular	28
B. Transfección transitoria con PEI (polietilenimina)	30
C. Inducción de muerte celular por NK1R/SP	30
D. Inmunocitoquímica	31

BIOLOGIA MOLECULAR	32
A. Plásmidos.....	32
B. Western Blot.....	32
C. Ensayos de Actividad Transcripcional.....	36
ANALISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA	37
IX. RESULTADOS.....	38
• Inducción de muerte celular autofágica por NK1R/SP.	38
• La actividad transcripcional de NR4A1 puede ser regulada por SUMOilación.	39
• La localización intracelular de NR4A1 es predominantemente nuclear en las mutantes no SUMOilables, y citoplásmica en la mutante no fosforilable.	44
• La vida media de NR4A1 no se altera cuando se inhibe la SUMOilación.	50
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
• La actividad transcripcional de NR4A1 puede ser regulada por SUMOilación.	53
a) La actividad transcripcional presenta una gran diferencia en cuanto a la magnitud cuando se utiliza el elemento NurRE o NBRE.	53
b) La actividad transcripcional de las mutantes es semejante a la de la silvestre en células proliferando.	54
c) La actividad transcripcional de casi todas las mutantes es mayor que la de la silvestre en células muriendo por autofagia.....	54
• La localización intracelular de NR4A1 es predominantemente nuclear en las mutantes no SUMOilables y citoplásmica en la mutante no fosforilable.	55
• La vida media de NR4A1 no se altera cuando se inhibe la SUMOilación.	57
XI. CONCLUSIONES	59
XII. PERSPECTIVAS.....	60
XIII. REFERENCIAS	61
XIV. ANEXO I	66
SOLUCIONES	66

I. RESUMEN

NR4A1 es un receptor nuclear independiente de ligando que pertenece a la super familia de receptores de hormonas tiroideas, interviene en diversos procesos celulares como apoptosis, diferenciación, proliferación y regulación del metabolismo. NR4A1 también se activa cuando se induce muerte autofágica mediante la activación del receptor NK_1R por su ligando la Sustancia P; sin embargo, aún no ha sido descrito su mecanismo de acción. La autofagia es un proceso celular de degradación de componentes celulares a través de la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que puede favorecer la sobrevivencia o promover la muerte celular.

El presente trabajo propone que NR4A1 realiza distintas funciones dependiendo de las modificaciones post traduccionales que presenta. En particular, se estudió el papel de la SUMOilación como regulador de la actividad transcripcional, la localización y estabilidad de NR4A1, ya que la SUMOilación regula estas características en otras proteínas. Además, se evaluó una posible relación con la fosforilación en la regulación de la actividad de NR4A1.

En resumen, se encontró que NR4A1 incrementa su actividad transcripcional en respuesta a la inducción por Sustancia P, misma que fue mayor en mutantes carentes de sitios predichos de SUMOilación. Las mutantes en SUMOilación permanecieron en el núcleo y no se observó movilización de estas al citoplasma. Por otra parte, se encontró que la estabilidad de NR4A1 endógeno permanece sin cambios aún durante la inhibición de la SUMOilación. Estos resultados sugieren que la SUMOilación regula negativamente la actividad transcripcional de NR4A1, mientras que la localización y la estabilidad parecen no ser reguladas por este tipo de modificación. Además, de forma interesante se observó que una mutante incapaz de fosforilarse por ERK2 se localizó principalmente en el citoplasma. En conclusión, los datos obtenidos indican una regulación por SUMOilación y fosforilación de las funciones del receptor nuclear NR4A1.

II. ABREVIATURAS

AKT - Cinasa de serinas/treoninas (también llamada proteína kinasa B, PKB)

AMP- *Adenosine monophosphate* Adenosín monofosfato

ATG – *Autophagy Related Gen* Gen relacionado a la autofagia

CHX – Cicloheximida

DBD – *DNA Binding Domain* Dominio de unión al DNA

ERK - *Extracellular-signal-regulated kinase* Cinasa reguladora de señales extracelulares, perteneciente a la familia de las MAPK

HDAC – *Histone Deacetylase* Deacetilasa de Histonas

HEK293T – *Human Embryonic Kidney* Células embrionarias de riñón humano con antígeno T de SV40

HSP – *Heat Shock Protein* Proteína de choque térmico

IGF – *Insulin-like Growth Factor* Factor de crecimiento tipo insulina

LBD – *Ligand Binding Domain* Dominio de unión a ligando

LC3 – *Microtubule-associated protein light chain 3* Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase* Cinasa activada por mitógenos

MHC – *Major Histocompatibility Complex* Complejo Mayor de Histocompatibilidad

NBRE – *NGFI-B Response Element* Elemento de respuesta a NGFI-B

NK₁R – *Neurokinine 1 Receptor* Receptor de neurokinina 1

NurRE – *Nur Response Element* Elemento de respuesta a Nur

PI3K - *Phosphatidylinositide 3-kinase* Fosfoinositol 3-cinasa

POMC - *Pro-opiomelanocortin* Pro-opiomelanocortina

Raf1 - *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* Cinasa que participa en la cascada de MAPK (también llamada C-Raf)

RXR - *Retinoid X receptor* Receptor X retinoide

siRNA – *Small Interference RNA* RNA pequeño de interferencia

SP – Sustancia P

SUMO – *Small Ubiquitin-like Modifier* Modificador pequeño similar a ubiquitina

TNF- *Tumoral Necrosis Factor* Factor de necrosis tumoral

TOR– *Target of rapamycin* Receptor de rapamicina (mTOR en mamíferos)

ULK – Complejo que participa en la inducción de la autofagia

Vsp – *Vacuolar protein sorting* Proteína de selección vacuolar

III. INTRODUCCIÓN

EL RECEPTOR NUCLEAR NR4A1

NR4A1, también llamado Nur77, NGFI-B, TR3, entre otros nombres, pertenece a la subfamilia denominada NR4A que a su vez pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas tiroideas. La subfamilia NR4A está constituida por otros dos miembros: NR4A2 (Nurr1) y NR4A3 (Nor1). Todos los miembros funcionan como factores transcripcionales independientes de ligando (ya que hasta el momento no se ha descrito un ligando natural) y como genes de respuesta inmediata con un papel crítico en diferenciación, proliferación y apoptosis. Esta subfamilia actúa también en la regulación transcripcional de la homeostasis de glucosa, en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, así como en la viabilidad celular (Zhao & Bruemmer, 2010). Además, pueden ser activados por un amplio rango de señales como estrés, ácidos grasos, factores de crecimiento, citocinas, hormonas, neurotransmisores, así como por estímulos físicos (Maxwell y Muscat, 2006).

NR4A1 dentro de su secuencia cuenta con un dominio de unión al DNA (DBD) altamente conservado entre los miembros de la subfamilia, un dominio de transactivación en el extremo amino-terminal y un dominio de unión a ligando (LBD) en el extremo carboxilo-terminal (Figura 1).

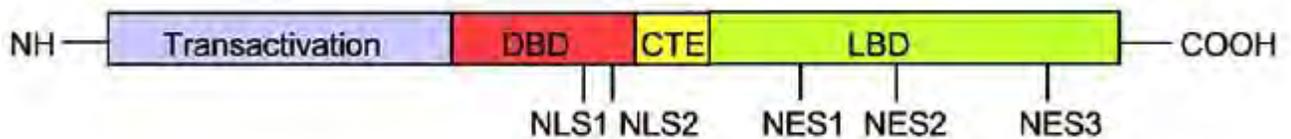


Figura 1. Estructura de NR4A1. Se compone del fragmento de transactivación (azul), el dominio de unión a DNA llamado DBD (rojo) dentro de la cual se encuentran dos señales de localización nuclear NLS 1 y 2, una región constante (amarillo), y el dominio de unión a ligando, LBD (verde) con 3 sitios de señalización para exporte nuclear NES 1,2 y 3. (Modificado de: Hsu et al., 2004).

Este receptor es capaz de unirse como monómero a la secuencia consenso AAAGGTCA (NBRE, elemento de respuesta NGFI-B) o en forma de homodímero a la secuencia AAAT (G/A)(C/T)CA (NurRE, elemento de respuesta Nur) para activar la expresión de diferentes genes blanco (*Li et al., 2006*). NR4A1 se encuentra ampliamente distribuido en tejidos periféricos como el timo, músculo, pulmón, hígado, testículos, ovarios y próstata así como en las glándulas adrenal, tiroidea y pituitaria (*Hsu et al., 2004*). En el cerebro se expresa en neuronas del núcleo estriado, núcleo accumbens y corteza prefrontal (*Campos-Melo et al., 2013*).

FUNCIONES DE NR4A1

Este receptor participa en una gran cantidad de procesos. En el caso del sistema inmune media la apoptosis de células T, y participa en la selección negativa y positiva durante el desarrollo de estas células en el timo (*Zhou et al., 1996*). NR4A1 puede tener también una función anti-apoptótica ya que es capaz de disminuir la actividad de algunas caspasas (-3 y -8) cuando se induce apoptosis por factor de necrosis tumoral (TNF- α) (*Suzuki et al., 2003*). Por otro lado en 2003 se reportó que la sobreexpresión del receptor NR4A1 acelera la progresión del ciclo celular, lo que favorece una rápida proliferación de células del pulmón (*Kolluri et al., 2003*). Dentro del metabolismo, estimula la gluconeogénesis en órganos como el hígado (*Pei et al., 2006*), aumenta la sensibilidad a insulina en el músculo esquelético (*Fu et al., 2007*), y recientemente se le ha identificado como un regulador negativo de la AMPK, al evitar su activación a través de la interacción y secuestro de LK1B, cinasa que lleva a cabo la fosforilación de AMPK en el citoplasma (*Zhan et al., 2012*).

Recientemente se demostró que miembros de la subfamilia NR4A inducen la reparación del DNA cuando se rompe la doble cadena. En respuesta a daño por la exposición a radiación ionizante, se observa la presencia tanto de NR4A1 como de NR4A2, los cuales se localizan en los sitios dañados del DNA, en donde son fosforilados por la cinasa dependiente de DNA denominada DNA-PK, lo que promueve la reparación (*Malewicz et al., 2011*).

Cada una de sus funciones depende del estímulo que genere la expresión de NR4A1, atribuyéndole en ocasiones funciones antagónicas dentro de la célula, como en el caso de la sobrevivencia y muerte. A su vez estas funciones dependen de modificaciones post-traduccionales que alteran su localización celular. NR4A1 se encuentra tanto en el núcleo, actuando principalmente como factor transcripcional regulando la expresión de genes específicos; como en citoplasma actuando a través de su interacción con proteínas específicas, por ejemplo cuando se transloca del citoplasma a la mitocondria para formar un complejo con la proteína anti-apoptótica Bcl-2, lo cual provoca un cambio en su conformación que expone el dominio BH3, haciéndolo semejante a proteínas pro-apoptóticas como Bax. Como consecuencia, induce la liberación del citocromo C y por lo tanto apoptosis. Sin embargo la interacción de NR4A1 con otras proteínas no es exclusiva de su localización citoplásmica, también modula la acción de otras proteínas cuando se localiza en núcleo; por ejemplo, cuando participa en la reparación del DNA interacciona directamente con la DNA-K favoreciendo su activación. Por otro lado durante su participación en la regulación del metabolismo y la sobrevivencia celular actúa mediante su actividad transcripcional (*Mohan et al., 2012*). También puede actuar como un represor transcripcional; por ejemplo, en respuesta a NGF interactúa con el receptor de retinoides RXR a través de heterodímeros, estos heterodímeros interaccionan con el motivo DR5 regulando la transcripción (*Bruemmer, 2010*).

REGULACIÓN DE NR4A1

La regulación transcripcional de NR4A1 tanto negativa como positivamente ocurre principalmente a través de HDACs (*histone deacetylases*, por sus siglas en inglés) clase II. Durante la regulación negativa, las HDACs son reclutadas al promotor de NR4A1 lo que provoca un cambio en la estructura de la cromatina y permite la interacción de un complejo que impide la transcripción de NR4A1. Formando parte de este complejo se encuentra MEF2, el cual es controlado por HDACs a través de la proteína Cabin1 dependiente de Ca^{2+} . Entre las deacetilasas que participan en esta represión se encuentran HDAC4 y 7. La regulación positiva ocurre a través de la supresión del complejo de HDACs, antes

mencionado, que inhibe su transcripción. Esta supresión se asocia a cambios en el cAMP e incremento del flujo de calcio hacia el interior de la célula (*Hsu et al., 2004*).

La regulación post-traducciona de NR4A1 ocurre principalmente mediante fosforilación (se describe mas adelante); además NR4A1 se acetila en su dominio de unión a ligando por la acetiltransferasa de histonas p300, lo que evita su degradación y como consecuencia aumenta la expresión de sus genes blanco (*Kang et al., 2010*).

FOSFORILACIÓN DE NR4A1

La fosforilación de NR4A1 regula su actividad transcripcional y localización aumentando su estabilidad en el citoplasma lo que favorece la interacción con otras proteínas. NR4A1 es fosforilado a través de la acción de diversas cinasas como: JNK (*Kolluri et al., 2003*), ERK2 (*Jacobs et al., 2004*) y miembros de la familia de las MAP cinasas (*Katagiri et al., 2000*); también es fosforilado por Akt (proteína cinasa B, PKB por sus siglas en inglés), la cual es una molécula importante en la transducción de señales anti-apoptóticas y de proliferación en células T.

Por lo tanto NR4A1 contiene múltiples sitios en donde ocurre esta modificación. Algunos ejemplos de ellos son la Ser105 que induce su exporte nuclear cuando NR4A1 se encuentra formando un complejo con RXR (*Katagiri et al., 2000*); la Ser350, modificada por Akt ha demostrado ser un sitio de represión para su actividad transcripcional (*Masuyama et al., 2001*); la Ser354 modificada por pp90^{RSK} (cinasa ribosomal s6), también disminuye su actividad debido a que afecta su capacidad de unirse al DNA; y la Thr142 que es modificada por ERK2 (*Slagsvold, 2002*); entre otros. El dominio amino terminal de NR4A1 ha sido señalado como una sección importante en la regulación de su fosforilación ya que aproximadamente el 30% de ellas ocurren en este dominio (*Moll et al., 2006*).

SUMOILACIÓN

La SUMOilación es una modificación post-traducciona reversible que consiste en la adición de la proteína SUMO (*small ubiquitin-related modifier* por sus siglas en inglés) a residuos de lisina en las proteínas blanco. La mayoría de las modificaciones por SUMO se presentan en secuencias consenso ψ KXE (donde ψ es un residuo alifático: leucina, isoleucina, o valina; K lisina, X es cualquier otro aminoácido y E ácido glutámico) (Dohmen, 2004). La proteína SUMO tiene un peso de 10 kDa aproximadamente y presenta una gran similitud con la estructura tridimensional de la ubiquitina así como con su sistema de conjugación, aunque únicamente comparte un 20% de la secuencia de aminoácidos.

La SUMOilación regula procesos celulares como la transcripción, replicación, segregación cromosómica y reparación de DNA: también modifica la localización y la estabilidad de proteínas así como las interacciones entre ellas (Johnson, 2004; Gareau y Lima, 2010). El gen de SUMO se encuentra conservado en eucariontes, tanto en invertebrados como vertebrados. En levadura existe un único gen que codifica para SUMO, mientras que en mamíferos existen 4 isoformas: Sumo 1-4, cada una codificada por distintos genes. La mayoría de SUMO-1 presente en las células se encuentra en forma conjugada y parece ser la más abundante en condiciones normales, mientras que SUMO-2 y -3 se encuentran principalmente como proteínas libres disponibles para una rápida conjugación en caso de una situación de estrés; estas últimas presentan entre ellas un 97% de similitud en su secuencia, por lo que no hay anticuerpos que las distingan y frecuentemente se denominan SUMO-2/3; SUMO 4 es la isoforma identificada más recientemente y se expresa principalmente en células de riñón, nódulos linfáticos y bazo (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

La unión de SUMO a sus blancos ocurre a través de un enlace isopeptídico que se forma entre el carboxilo terminal de SUMO y el grupo ϵ -amino del residuo de lisina del sustrato. Inicialmente se requiere de un proceso de maduración en el cual SUMO interactúa con proteasas específicas (ULP1) que lo cortan y exponen un residuo de glicina en su carboxilo terminal. La disponibilidad de esta glicina en el péptido maduro le permite interactuar con una cisteína presente en la enzima E1 (formada por

el complejo Aos1-Uba2 en levadura y por SAE1-SAE2 en mamíferos), formando un enlace tipo tioéster dependiente de ATP, este paso es llamado activación. Una vez activada, SUMO pasa de la enzima E1 a la E2 o enzima de conjugación Ubc9, la cuales la única identificada; finalmente la ligación a su sustrato ocurre con la interacción de enzimas E3, entre las que se encuentran: Siz/PIAS, RanBP2 y Pc2, que lo unen al residuo de lisina de la proteína blanco (Johnson, 2004). Las proteínas modificadas pueden estar sujetas a de-SUMOilación mediada por isopeptidasas Ulp1 y 2 en levaduras y sus seis homólogos en mamíferos SENP1-3 y SENP5-7 que proveen un mecanismo de regulación entre la cantidad de sustrato modificado y la disponibilidad de SUMO maduro (Figura 2). En la mayoría de los casos se da la adición de una sola molécula de SUMO, sin embargo la unión de cadenas de poli-SUMO, como las que se forman en el caso de la ubiquitina, se ha comprobado tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque sin una función particular descrita hasta el momento (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

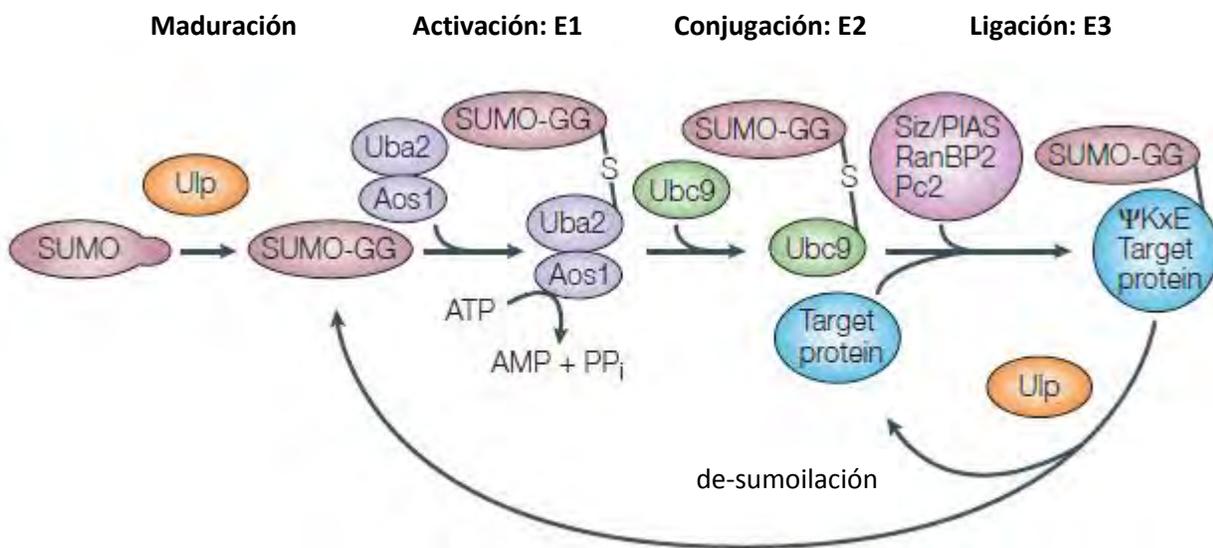


Figura 2. Mecanismo de SUMOilación. Se detallan los cuatro pasos necesarios para la unión de SUMO con su proteína blanco. Ver detalle en el texto (Modificado de: Seeler y Dejean, 2003).

Entre las proteínas que pueden presentar esta modificación, si bien se encuentran proteínas citoplasmáticas como: RanGAP1, IκBα, GLUT1 y GLUT4 entre otras, la SUMOilación es más una modificación común en proteínas nucleares, ya que en varios sustratos (SP100, HDAC4, MDM2) en los que se eliminaron las regiones de localización nuclear ya no se presentó esta modificación. De igual

manera la SUMOilación puede afectar la entrada de proteínas al núcleo. Un ejemplo es la proteína adenoviral E1B, ya que cuando se expresa una mutante en SUMOilación permanece en el citoplasma, mientras que si se sobreexpresa la silvestre se deriva en un incremento de la movilidad de E1B al núcleo (Seeler y Dejean, 2003).

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR SUMOILACIÓN

Los factores de transcripción tienen un papel indispensable en la regulación de la expresión genética y en los últimos años se ha identificado un gran número de ellos que presentan SUMOilación; esta modificación puede impactar de distintas formas en su actividad, ya sea compitiendo por las lisinas blanco, que pueden recibir otros tipos de modificación post-traduccional como ubiquitinación o acetilación, o favoreciendo la interacción de sus sustratos con otras moléculas. Si bien los factores de transcripción que son SUMOilados principalmente presentan una disminución en su actividad transcripcional, entre los que se incluye Elk-1 de la vía de señalización de las MAP cinasas, también existen ejemplos de factores de transcripción cuya actividad transcripcional aumenta, como es el caso de TCF4 e IKAROS; por lo tanto se propone que la SUMOilación puede alterar la actividad transcripcional a través de la interacción con co-represores o co-activadores (Dohmen, 2004; Gill, 2005).

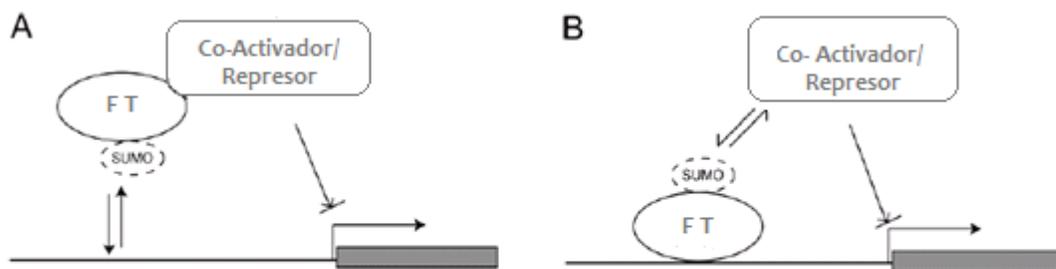


Figura 3. Posibles mecanismos de regulación de factores de transcripción por SUMOilación. A. Regulación de la transcripción impidiendo la unión del FT al DNA **B.** Regulación de la transcripción impidiendo la unión del FT con proteínas represoras/activadoras. FT factor transcripcional (Modificado de: Lyst y Stancheva, 2007).

En este sentido SUMO puede afectar la unión del complejo factor transcripcional-activador/represor con el DNA, lo que impediría la asociación con su promotor específico (Figura 3A); por otro lado SUMO puede interferir directamente en la asociación del factor transcripcional con su activador/represor y modificar positiva o negativamente, su actividad transcripcional (Figura 3B). Este mismo tipo de regulación se presenta de forma indirecta con la SUMOilación de proteínas accesorias que participan en la activación/represión del factor transcripcional modificado, generando cambios en su degradación y/o localización y, en consecuencia, su disponibilidad para formar el complejo de transcripción (*Lyst y Stancheva, 2007*).

INHIBICIÓN DE LA SUMOILACIÓN

Algunas proteínas virales fueron de los primeros sustratos identificados en ser SUMOilados. Los virus han desarrollado distintos mecanismos para intervenir en las vías de señalización de las células para asegurar su reproducción y sobrevivencia, lo que a su vez los hace útiles como herramientas en el estudio de las mismas. La relación entre la SUMOilación y las proteínas virales puede darse de dos maneras, que los virus contengan proteínas que se SUMOilen, o bien que las mismas proteínas virales modifiquen mediante SUMOilación a las proteínas de la célula hospedera, evitando la SUMOilación *de novo* o exacerbando la de-SUMOilación (*Chiocca, 2007*). El primer caso identificado es el de Gam1, proteína del adenovirus CELO (*Chicken Embryo Lethal Orphan*, virus letal de embrión de pollo), que es esencial para la replicación del virus. Gam1 disminuye la SUMOilación de proteínas de la célula hospedera a través de la disminución de las enzimas E1 y E2 que participan en esta modificación (*Boggio et al., 2004*). La disminución de las enzimas E1 y E2 ocurre a través de la degradación del heterodímero que forma la enzima E1 por el sistema ubiquitina-proteosoma, Gam1 interacciona con una E3 ligasa que las ubiquitina favoreciendo su degradación; por otro lado el mecanismo por el cual ocurre la disminución de la enzima E2 (Ubc9) aún no es claro, sin embargo se propone que ocurre como consecuencia de la falta de E1, ya que está reportado que la degradación de alguna de las enzimas del sistema de SUMOilación favorece la degradación de las enzimas posteriores (*Chiocca, 2007*).

INTERACCIÓN DE SUMO CON OTRAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES

Otras modificaciones post- traduccionales como la fosforilación, acetilación y ubiquitinación pueden participar en la regulación de la SUMOilación. En el caso específico de la fosforilación se tienen ejemplos tanto de regulación positiva como negativa de los sustratos SUMOilados. La regulación positiva ocurre a través de la fosforilación de sitios cercanos a la secuencia consenso de SUMOilación. El incremento de la SUMOilación en estos sustratos puede deberse a que la fosforilación origina cambios conformacionales que exponen los sitios blanco SUMOilables, y a que la carga negativa que le confiere la fosforilación facilita la modificación de las lisinas blanco; dentro de las proteínas que presentan esta relación se encuentran factores transcripción de choque térmico como HSF1, HSF4 y el factor MEF4 (*Wilkinson y Henley, 2010*). Cuando ocurre regulación negativa por parte de la fosforilación, se manifiesta con la disminución de la SUMOilación de proteínas previamente fosforiladas, debido a que la fosforilación genera el reclutamiento de isopeptidasas que impiden la interacción de Ubc9 y las ligasas E3 con el sustrato. Proteínas como c-Fos, c-Jun y p53 presentan estas interacciones (*Bossis y Melchior, 2006*). Se ha identificado una secuencia consenso $\Psi KxExxSP$ llamada secuencia PDSM (*Phosphorylation Dependent Sumoylation Motif*, por sus siglas en inglés) que generalmente favorece la SUMOilación y se encuentra presente en varias proteínas en las que la SUMOilación y fosforilación ocurren en residuos contiguos; la mayoría de estas proteínas son reguladores transcripcionales (*Hietakangas et al., 2006*).

Por otro lado, existe una relación de competencia entre la acetilación y la SUMOilación, ya que en ambos casos el blanco es un residuo de lisina. Un ejemplo de esta relación sucede en el co-activador transcripcional p300, ya que es necesaria su de-acetilación mediante SIRT1 para que sea SUMOilado de forma eficiente (*Bouras et al., 2005*). Se ha identificado también un motivo presente en proteínas potencialmente SUMOilables, en el que se incluye una lisina que es capaz de SUMOilarse y acetilarse, llamado “switch SUMO- acetil”. En este caso se favorece la SUMOilación sobre la acetilación (*Wilkinson y Henley, 2010*).

MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso necesario en la vida de todo organismo, que se presenta en diversas etapas de la vida, desde etapas muy tempranas de su formación durante el desarrollo embrionario, como a lo largo de la vida de cada una de las células que lo forman ya sea para en el mantenimiento de la homeostasis del tejido, como respuesta a cambios del ambiente, o en el envejecimiento, entre otras. Por lo tanto su estudio y comprensión es de gran importancia.

El concepto de muerte celular como proceso fisiológico fue descrito por primera vez hace alrededor de 150 años. Posteriormente se reportó que la muerte celular ocurría durante la metamorfosis de invertebrados y vertebrados inferiores, el desarrollo de mamíferos, así como después de distintos tipos de daño como: químicos, lesiones mecánicas, radiación e hipoxia (*Majno & Jori, 1995*). Sin embargo, después de numerosas descripciones y términos utilizados para nombrar a la muerte celular con distintas características y en diversos tejidos, es hasta 1972 que es propuesto por Kerr el término “apoptosis” para describir un tipo de muerte celular con un “papel opuesto pero complementario a la mitosis en la regulación de las poblaciones celulares”, y por lo tanto tan importante como la proliferación celular para el desarrollo de los organismos y la homeostasis de los tejidos. Al observar que este tipo de muerte ocurre en el desarrollo de manera reproducible en el tiempo y el espacio, se establece el concepto de “muerte celular programada”, es decir, un proceso programado que controla la eliminación de las células que ya no son necesarias en el organismo (*Bursch et al., 2000*); este programa es controlado genéticamente e iniciado internamente por la célula. El mecanismo de muerte celular programada mas frecuente es la apoptosis, durante la cual las células se encogen y se vuelven mas densas bajo el microscopio; la cromatina y el citoplasma se condensan; ocurre fragmentación del núcleo; no se presentan cambios morfológicos en otros organelos (ej. mitocondria); se observa la presencia de protuberancias en la membrana celular, y finalmente la célula se fragmenta en los llamados cuerpos apoptóticos. Las células apoptóticas son degradadas por macrófagos o células vecinas (*Bursch, 2004*).

La muerte celular programada puede presentarse con características diferentes a la apoptosis descrita anteriormente, lo cual sugiere la existencia de varios mecanismos de muerte celular programada. Al observar las diferentes morfologías durante el desarrollo de vertebrados, se propuso la siguiente clasificación: muerte por apoptosis ó Tipo I, muerte por autofagia ó Tipo II y muerte citoplásmica ó Tipo III (Clarke, 1990). La característica principal para la muerte por autofagia es la formación de vesículas que se fusionan a los lisosomas donde se degradarán componentes específicos de la propia célula. Se determina que un tipo de muerte es autofágico cuando la célula sobrevive al impedir el funcionamiento de la autofagia.

AUTOFAGIA

La autofagia es el nombre que recibe el proceso intracelular que tiene como objetivo la degradación de componentes citosólicos tales como: proteínas de vida media larga, lípidos, azúcares, nucleótidos, organelos completos e incluso patógenos dentro de los lisosomas (Yang & Klionsky, 2010₁); en condiciones fisiológicas este proceso favorece la remoción de dichos componentes para su reciclado, necesario para el control de calidad de la célula (Rami, 2009). La autofagia favorece la supervivencia celular en respuesta a condiciones de estrés, por ejemplo durante la falta de nutrientes, proporcionando aminoácidos obtenidos del reciclamiento y que serán utilizados para generar energía y preservar el balance energético de la célula.

Hasta el momento se han descrito tres tipos de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y macroautofagia (Cuervo, 2004; Platini et al., 2010), en los tres casos los lisosomas proporcionan las enzimas necesarias para la degradación de los componentes seleccionados, la diferencia principal es la vía por la cual estos componentes llegan al lisosoma. También se observan diferencias en sus sustratos, regulación y selectividad, así como en las condiciones en las cuales cada una es activada (Figura 4).

Durante la microautofagia el secuestro de los sustratos que serán degradados ocurre mediante una deformación de la membrana del lisosoma que los envuelve y transporta al lumen del organelo, este proceso participa en el recambio basal de componentes de la célula en condiciones normales. En

el caso de la autofagia mediada por chaperonas, proteínas solubles del citosol son reconocidas a través de un dominio específico y son translocadas a través de la membrana lisosomal por chaperonas y co-chaperonas (como Hsp70); este tipo de autofagia se observa de manera basal en la mayoría de los tejidos, sin embargo puede aumentar su activación en situaciones donde la célula se enfrente a estrés oxidativo, nutricional o tóxico (Platini et al., 2010; Sridhar et al., 2012).

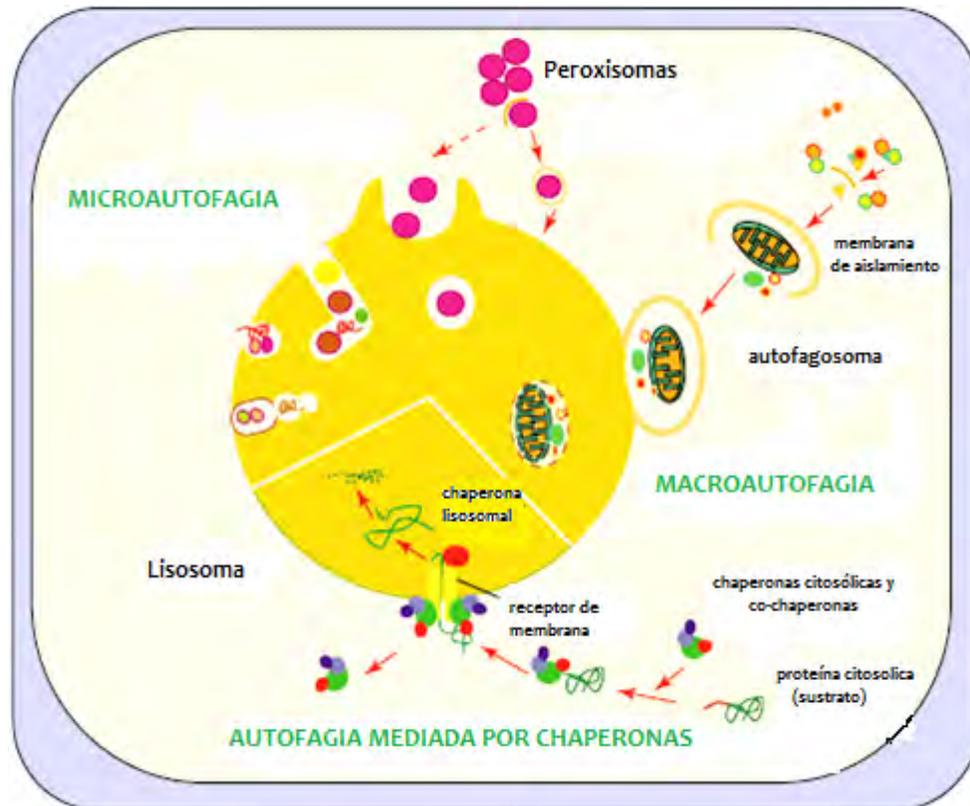


Figura 4. Tipos de autofagia. **Macroautofagia**, formación de autofagosoma a partir de la membrana de aislamiento que se fusionará con el lisosoma. **Microautofagia**, los componentes son invaginados directamente por la membrana del lisosoma. **Autofagia mediada por chaperonas**, participación de chaperonas y co-chaperonas para la transportación de las proteínas al lisosoma. (Modificado de Sridhar et al., 2012).

Durante la macroautofagia (referida como autofagia en adelante) se forma una vesícula de doble membrana que envuelve los componentes a degradar: inicia con la nucleación del fagóforo, estructura membranosa que se elonga para envolver a los componentes celulares que va a engullir, formando una estructura de doble membrana llamada autofagosoma; posteriormente esta vesícula se

fusiona con los lisosomas dando origen a una estructura llamada autolisosoma, la cual degradará los componentes secuestrados mediante las hidrolasas lisosomales (Galluzzi et al., 2008) (Figura 5).

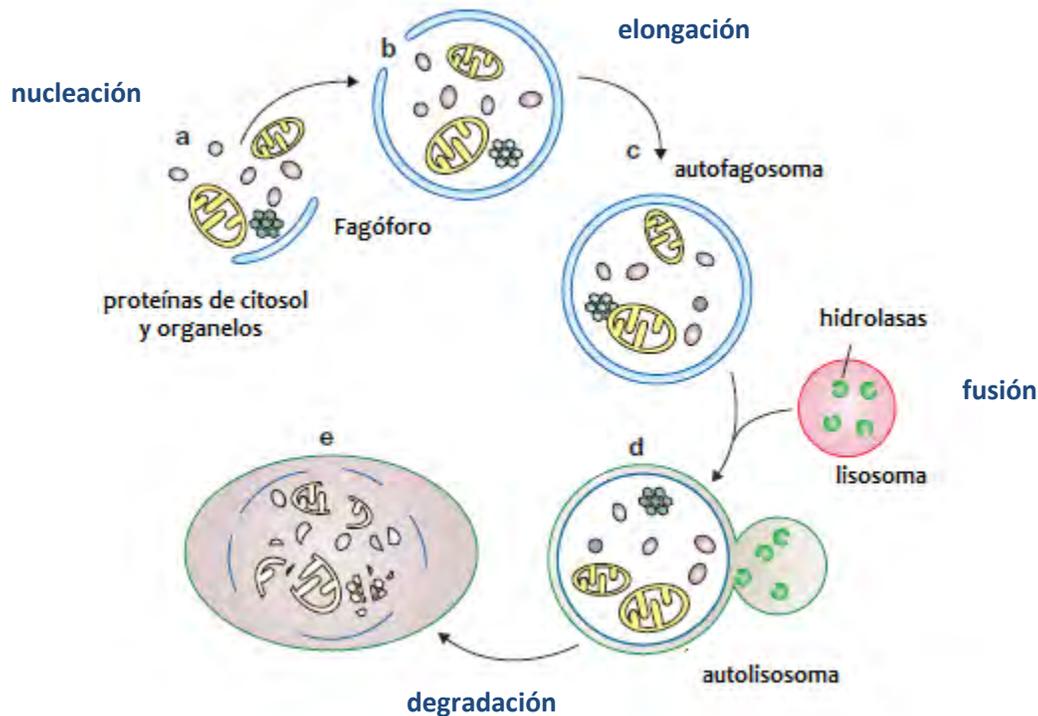


Figura 5. Formación de las vesículas autofágicas. Nucleación, elongación, fusión de las vesículas autofágicas y degradación de los componentes celulares. (Modificado de Xie y Klionsky, 2007).

A nivel molecular la caracterización de los componentes necesarios para la autofagia fue inicialmente hecha en levadura, con la identificación en 1997 del primer gen relacionado a la autofagia (Atg por sus siglas en inglés) denominado Atg1 (Matsuura et al., 1997). Posteriormente se describieron otros genes Atg que participan en este proceso. Para muchas de las proteínas codificadas por estos genes descritos en levadura se conocen ortólogos en eucariontes superiores, incluyendo el humano (Galluzzi et al., 2008) con más de 30 genes descritos a la fecha (Sridhar et al., 2012).

En la maquinaria molecular necesaria para la autofagia existen 4 complejos esenciales: a) *Atg1/ULK1* necesario para la inducción de la autofagia y la nucleación, al cual también se encuentra

asociado Atg13 y FIP200/Atg17; b) *Vsp34/PI3K* que forma complejo con p150 y Beclin1 el cual participa también en los primeros pasos de la formación de los autofagosomas; c) *Atg9/mAtg9* que es una proteína transmembranal que participa en la expansión de la membrana del autofagosoma; y d) dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina, *Atg12/Atg5* y *Atg8/LC3-PE*, que participan durante la elongación del fagóforo.

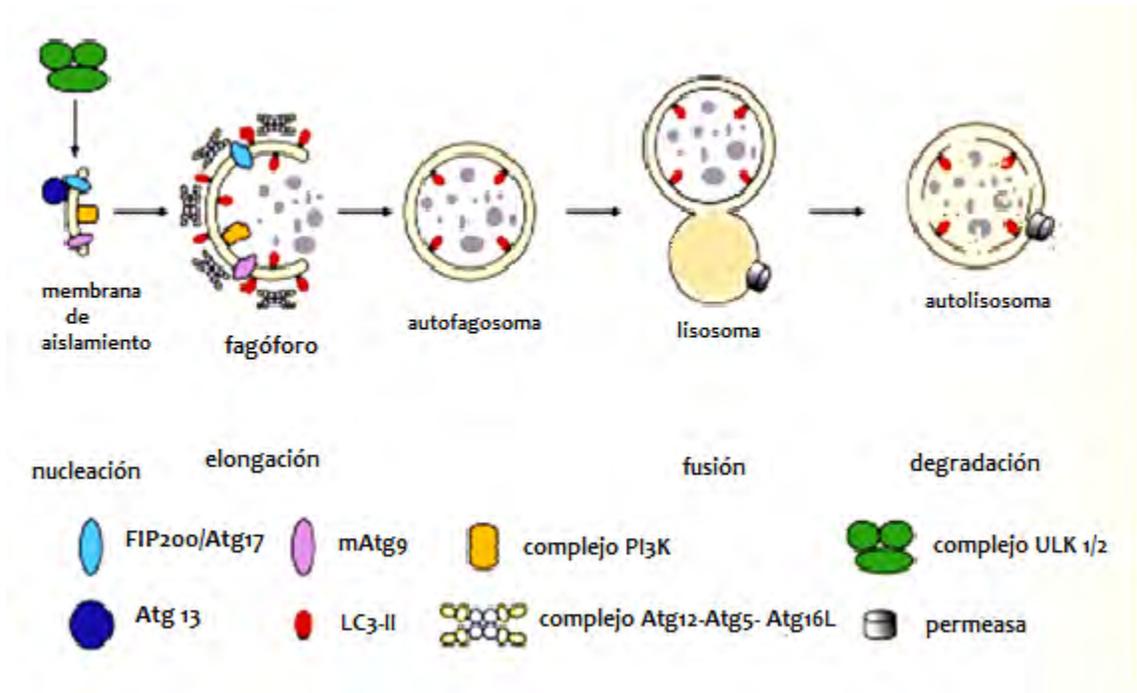


Figura 6. Mecanismo molecular de la autofagia. Detalle de las proteínas participantes en la formación de las vesículas, formación del fagóforo y reclutamiento a la membrana de los complejos mATG9, LC3-II, PI3K y Atgs necesarios para su formación. Las moléculas obtenidas de la degradación son transportadas al citosol a través de permeasas localizadas en la membrana del autolisosoma (Modificado de Yang & Klionsky, 2010₁).

Atg12 es un polipéptido que se une covalentemente a Atg5 a través de la participación de Atg7 y Atg10 (que actúan como E1 y E2 respectivamente, en el sistema de conjugación); el complejo Atg12-Atg5 interacciona con Atg16L, el cual oligomeriza facilitando la formación de los autofagosomas. Atg8/LC3 se genera como un precursor que es procesado en el extremo del carboxilo terminal por la proteasa Atg4, dando lugar a la llamada forma LC3-I. Esta forma tiene un residuo libre de glicina que es utilizado para conjugar la fosfatidiletanolamina (PE), reacción catalizada por las proteínas Atg7 y Atg3,

que en este caso actúa como la enzima E2. La forma lipidada resultante se llama LC3-II y se une a ambos lados de la membrana de aislamiento durante la elongación; LC3-II será posteriormente degradada en el autofagolisosoma junto con el material secuestrado (*Yang & Klionsky, 2010₁; Simonsen y Tooze, 2009*) (Figura 6).

La regulación de la autofagia puede ocurrir a través de modificaciones a nivel post-traduccionales de las moléculas que la ejecutan, ya sea por ubiquitinación, fosforilación o acetilación; la más común de ellas es la fosforilación que se presenta en varias de las proteínas que participan en la formación de los autofagosomas. Estas modificaciones a su vez pueden conferirle selectividad hacia ciertos contenidos citoplásmicos como agregados proteicos, organelos o patógenos (*Wong et al., 2011*).

IMPLICACIONES DE LA AUTOFAGIA

La autofagia además de mantener la homeostasis de la célula también participa en cambios celulares necesarios para el desarrollo y diferenciación de los organismos. Alteraciones en la autofagia se relacionan con diversas enfermedades neurodegenerativas y metabólicas, el desarrollo del cáncer, desórdenes musculares, alteraciones del sistema inmune y el envejecimiento (*Rami, 2009*).

En enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington y Parkinson se ha observado una acumulación de vesículas autofágicas. En particular durante estadios tempranos de la enfermedad de Huntington la autofagia es capaz de degradar a la huntingtina (la cual es causante de la enfermedad cuando tiene mutaciones que expanden una secuencia de poliglutaminas), antes de que esta forme agregados, pero una vez formados los agregados la autofagia es incapaz de degradarlos (*Komatsu et al., 2007*). En el caso de Alzheimer la inducción de la autofagia favorece la producción intracelular del péptido β -amiloide que es más tóxico que el secretado; durante la enfermedad hay una maduración deficiente de las vesículas autofágicas al no ser capaces de fusionarse a los lisosomas y por lo tanto hay acumulación del péptido β -amiloide; de hecho la supresión de la autofagia disminuye la formación de éstos agregados (*Yu et al., 2005*). Recientemente se observó *in vivo* que la secreción

de β -amiloide y formación de placas dependen de la autofagia, en este estudio los ratones nulos para autofagia presentaron una disminución en la formación de placas amiloides, atribuyéndole este efecto a que la autofagia promueve la secreción β -amiloide al espacio extracelular, y que su ausencia inhibe esta secreción generando una acumulación del péptido y la formación de placas características de esta enfermedad (Nilsson, 2013). En la enfermedad de Parkinson, existe acumulación de autofagosomas, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer, los cuales se encargan de la remoción de agregados de la proteína α -sinucleína causante de esta enfermedad; el incremento en la cantidad de autofagosomas se atribuye a la excesiva activación de la autofagia, sin embargo el mal funcionamiento del lisosoma, presente en esta enfermedad, puede contribuir a esta acumulación (Dehay et al., 2010; Cheung e Ip, 2011).

En el caso del cáncer se reconoció la participación de la autofagia tras verificar que el gen de un componente esencial en la maquinaria autofágica, Beclin1/Atg6, está mutado monoalélicamente en el 40-70% de los casos de cáncer de mama, próstata y ovario. Sin embargo, es difícil establecer la relación específica que tiene la autofagia con el cáncer, ya que ésta puede contribuir de diferente manera dependiendo del contexto celular; se ha demostrado tanto una función anti-tumoral como pro-oncogénica. La función anti-tumoral se da por el control de calidad que de manera normal realiza la autofagia evitando la transformación de células sanas, además la autofagia participa en la regulación de la entrada de las células en fase G0 del ciclo celular, por lo tanto puede evitar una hiperproliferación durante la tumorigénesis. Durante estadios tempranos en el desarrollo de cáncer se ha observado que la autofagia disminuye en las células favoreciendo la acumulación de moléculas que generan desestabilización del genoma, lo cual favorece la tumorigénesis. Sin embargo conforme el tumor avanza la autofagia es activada nuevamente contribuyendo con la sobrevivencia de las células cancerosas al asegurar el abastecimiento de energía para la rápida división que ocurre en el tumor y la eliminación de componentes dañados causados por el mismo ambiente oncogénico o terapias anti-oncogénicas; estas observaciones otorgan a la autofagia un papel central en esta enfermedad (Sridhar et al., 2012).

Dentro del sistema inmune la autofagia puede favorecer la eliminación de patógenos que invaden las células a través de su degradación. Sin embargo también existen patógenos que han desarrollado la propiedad de utilizar a la autofagia como medio de sobrevivencia. Además de su función en la respuesta inmune, la autofagia interviene en el procesamiento y presentación de antígenos a las células T tanto en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) tipo I (*Münz, 2010*) como en el tipo II (*Nimmerjahn et al., 2003*).

Varios reportes establecen una relación entre la autofagia y el envejecimiento (*Rubinsztein et al., 2011*). En uno de ellos se demuestra que la autofagia disminuye en tejidos envejecidos, presentándose una caída en la expresión de proteínas que participan en su inducción (*Zhang y Cuervo, 2008*); por tanto la estimulación de la autofagia podría favorecer un aumento en la esperanza de vida. Una de las estrategias para estimular la autofagia es la restricción calórica, siendo éste el principal inductor fisiológico de la autofagia, utilizado en estudios realizados en diversas especies, entre ellas el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*Jia y Levine, 2007*). A través de la restricción calórica se activan sensores energéticos como AMPK y SIRT1, además de inhibir al factor de crecimiento tipo insulina (IGF) el cual a su vez genera la inhibición de TOR (*Kenyon, 2010*) y como consecuencia la activación de la autofagia. Aunque aún no se tiene identificado el mecanismo específico, SIRT1 puede participar desacetilando a varias proteínas como Atg5, Atg7 y Atg8 así como a diversos factores de transcripción como p53, FOXO1, 3 y 4 que participan en la regulación de la longevidad (*Saunders y Verdin, 2009*).

IV. ANTECEDENTES

MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA INDUCIDA POR NK₁R/ SP

El receptor de Neurokinina-1 (NK₁R) pertenece al grupo de los receptores acoplados a proteínas G que actúan a través de segundos mensajeros para la regulación de diversos mecanismos en la célula, su ligando es el neurotransmisor llamado Sustancia P (SP). NK₁R se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y se le ha relacionado con la señalización en respuesta al dolor, en el comportamiento, la depresión, y más recientemente en la formación de tumores (gliomas) (*Łazarczyk et al., 2007*).

Anteriormente se reportó en células neuronales que cuando es activado por su ligando, NK₁R es capaz de generar muerte celular con características no apoptóticas, ya que no se presenta la característica formación de protuberancias en la membrana, fragmentación nuclear ni translocación de fosfatidilserina, además de no ser sensible a inhibidores de caspasas (Zvad.fmk y BAF). La inducción de la muerte celular se observó también en células no neuronales (HEK293T, COS) en las que se expresó NK₁R y fueron estimuladas con SP, presentando el mismo efecto: en ambos casos ocurrió redondeo de las células y la formación de vesículas (Figura 7A) (*Castro-Obregón et al. 2002*). Dichas vesículas resultaron ser autofagosomas ya que se evaluó la presencia y localización de LC3-II, utilizado como marcador de autofagosomas y actividad autofágica, después de la inducción con NK₁R/SP mediante microscopia electrónica y Western blot mostrando en ambos casos un incremento significativo de LC3-II durante la inducción comparado con el basal; lo que llevó a estudiar la contribución de la autofagia en la muerte celular. Para demostrar que el mecanismo de muerte celular es de tipo autofágico se inhibió a la maquinaria autofágica mediante la molécula Spautin-1, que promueve la degradación de Beclina1 y PI3K-III, durante la inducción de la muerte; como resultado se observó una disminución en el número de células muertas, comprobando la participación de la autofagia (*Bouzas et al., 2012*).

Los receptores acoplados a proteínas G de forma general activan tres sistemas de segundos mensajeros: movilización intra- y extracelular de Ca^{2+} , movilización de ácido araquidónico, e incremento y acumulación de cAMP; sin embargo durante la muerte celular inducida por $\text{NK}_1\text{R}/\text{SP}$, la señalización es independiente de estos sistemas de segundos mensajeros, y ocurre a través de una vía alternativa mediada por la interacción del receptor con la proteína arrestina2 y la posterior activación de la vía de las MAP cinasas; arrestina2 forma un complejo con la cinasa Raf-1, que a su vez fosforila a MEK2 y ésta a ERK2 (Figura 7B) (Castro-Obregón *et al.*, 2004).

PARTICIPACIÓN DE NR4A1 DURANTE LA MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA INDUCIDA POR $\text{NK}_1\text{R}/\text{SP}$

Dado que este mecanismo de muerte depende de transcripción y traducción, se realizaron estudios de expresión diferencial utilizando microarreglos para identificar aquellos genes que se indujeran durante la muerte celular autofágica observada en la inducción con $\text{NK}_1\text{R}/\text{SP}$.

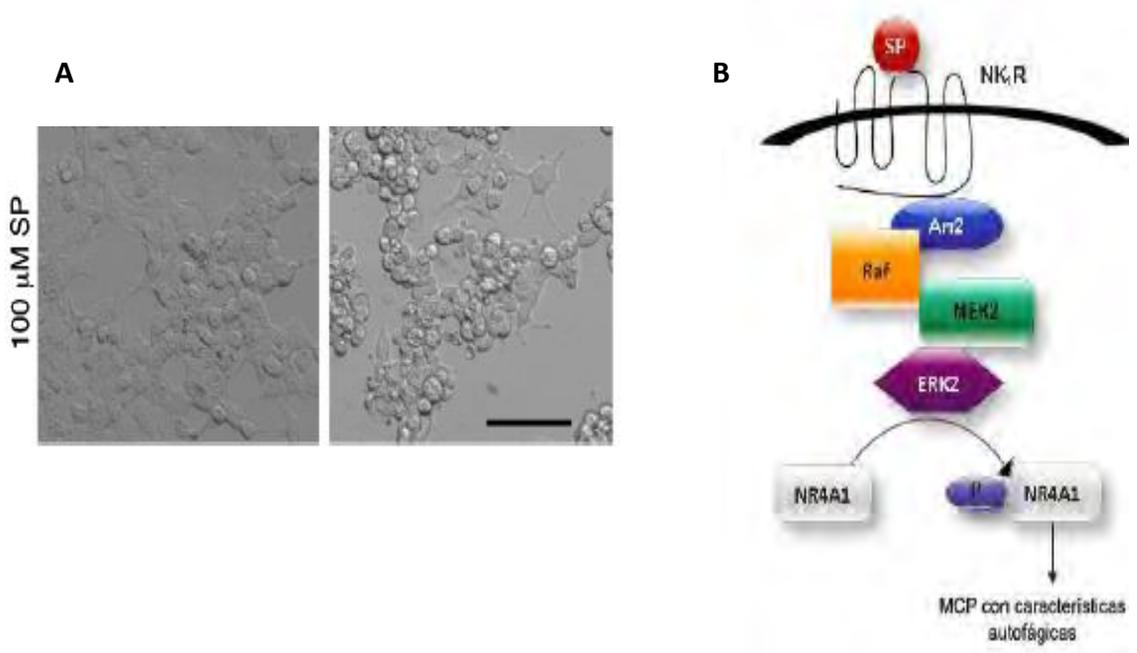


Figura 7. Muerte celular por $\text{NK}_1\text{R}/\text{SP}$. **A.** Células HEK293T transfectadas con un vector vacío pcDNA3.1 (panel izquierdo) o con NK_1R (panel derecho) tratadas con SP 100nM, respuesta 24 hrs posteriores a la exposición al tratamiento. Barra de escala 50 μm (Castro-Obregón *et al.*, 2002) **B.** Modelo de la vía de señalización que ocurre en la activación de la muerte celular autofágica por $\text{NK}_1\text{R}/\text{SP}$ (Castro-Obregón *et al.*, 2004).

De los transcritos analizados se encontró que 91 fueron inducidos en respuesta a SP, siendo el receptor nuclear NR4A1 de particular interés ya que reportes previos describen su participación en muerte celular por apoptosis en diferentes tipos celulares (*Li et al., 2006*); además de ser fosforilado específicamente por ERK2 (*Slagsvold et al., 2002*).

Durante la muerte celular inducida por NK₁R/SP, la expresión de NR4A1 se activa y su función es necesaria para la inducción de la muerte celular, ya que al utilizar mutantes dominantes negativas (que carecen ya sea del dominio de unión al DNA o del dominio de transactivación) y RNAs interferentes (RNAi) para NR4A1, el porcentaje de células muriendo disminuye. NR4A1 se fosforila en una treonina a las 3hrs de tratamiento con SP, tiempo al que se observa la mayor cantidad de NR4A1 presente en las células (Figura 8A y 8B).

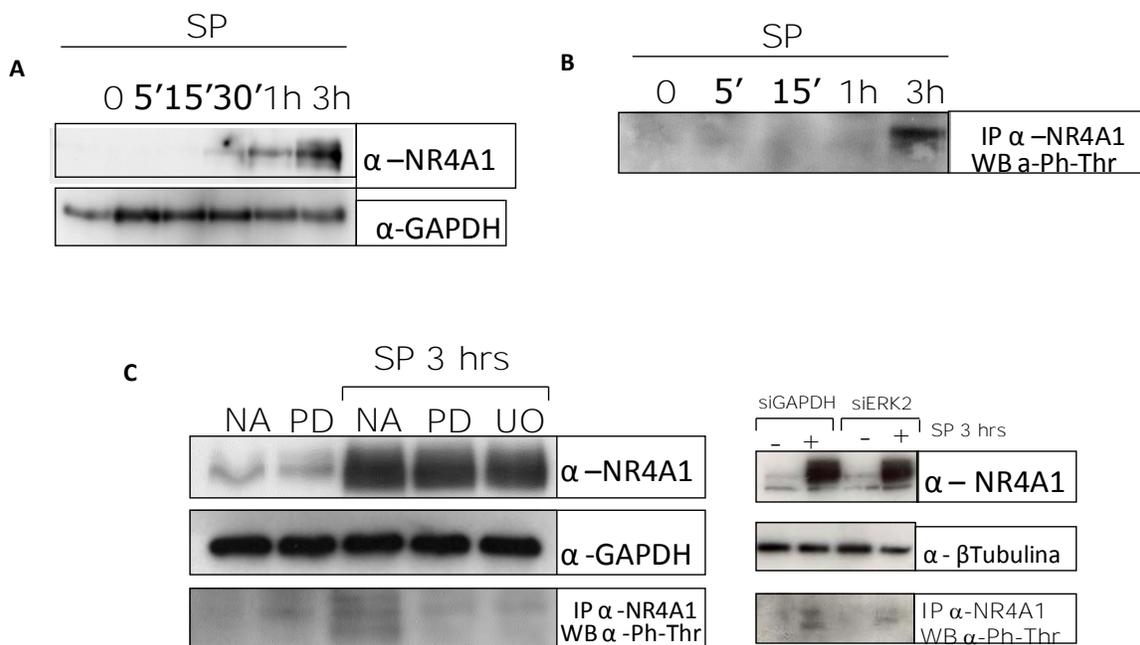


Figura 8. Fosforilación de NR4A. **A.** La expresión de NR4A1 se induce en respuesta a Sustancia P. **B.** NR4A1 se fosforila en una treonina a las tres horas de inducción con Sustancia P. **C** La fosforilación de NR4A1 se reduce al Inhibir MEK con PD98059 (PD), UO126 (UO), o bien al silenciar la expresión de ERK2 después de 3 horas de Sustancia P, se utilizaron como controles de carga a GAPDH y β-tubulina respectivamente. (*Castro-Obregón et al., 2004*).

La fosforilación ocurre por ERK2, ya que ésta disminuyó en presencia de dos inhibidores específicos de MEK: PD98059 y UO126, que por consecuencia inhiben la actividad de ERK, así como por RNAi para ERK2. Es interesante notar que la presencia de NR4A1 no depende de la señalización de ERK2, ya que al inhibir su actividad no se observó alteración en la cantidad de proteína presente (Figura 8C) (Castro-Obregón et al., 2004).

Durante la muerte celular inducida por NK₁R/SP parece que NR4A1 se estabiliza, ya que la expresión de NR4A1 a dirigida por un promotor constitutivo también responde a SP aumentando la cantidad de proteína. El mecanismo parece ser post-transcripcional, ya que la construcción utilizada carece de los extremos 5' o 3' no traducidos, por lo que no tiene elementos regulatorios naturales.

LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE NR4A1

La localización de NR4A1 es de gran importancia para la regulación de sus diversas funciones. Para estudiar el mecanismo por el cual NR4A1 induce muerte autofágica, se analizó por medio de inmunofluorescencia su localización subcelular después de 3 horas de inducción con SP, encontrándose la mayoría presente en el núcleo (Bouzas-Rodríguez, 2012). A pesar de ser clara la localización nuclear de NR4A1 en la mayoría de los casos, también fue posible observar una distribución citoplasmática en el 14% de las células (Figura 9).

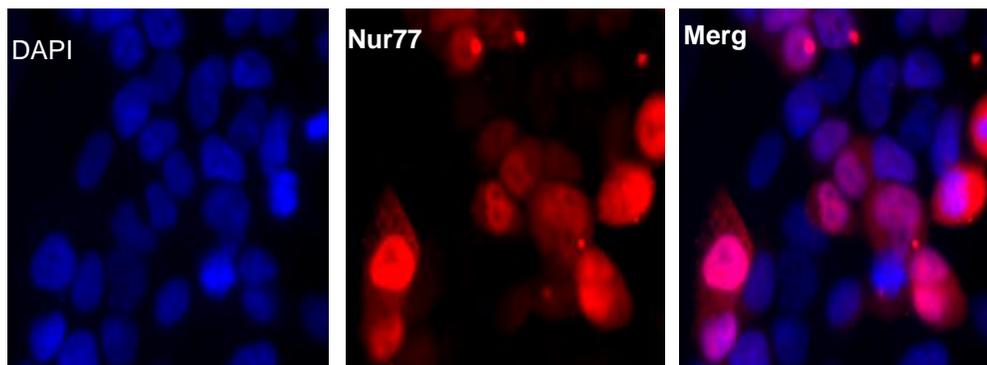


Figura 9. Localización celular de Nur77. Se observa en células HEK293T la localización de NR4A1 (rojo) tanto nuclear (DAPI) como en citoplasma, ampliación 40X (Bouzas-Rodríguez, 2012).

Debido a que NR4A1 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, no fue posible concluir si induce la muerte autofágica actuando ya sea como factor transcripcional o a través de la interacción con otras proteínas en el citoplasma. Es posible que actúe en ambos compartimentos celulares, ya que las dos mutantes dominantes negativas mencionadas anteriormente que inhiben la muerte celular se localizan: una exclusivamente en el citoplasma (la que carece del dominio de unión al DNA) y la otra exclusivamente en el núcleo (la que carece del dominio de transactivación). Por lo tanto, es necesario realizar más experimentos que permitan determinar de manera específica el mecanismo de acción de NR4A1.

SUMOILACIÓN DE NR4A1

Considerando que NR4A1 se estabiliza y se transloca del núcleo al citoplasma, se fosforila y que otros miembros de su familia como NR4A2 son modificados por SUMOilación (*Galleguillos et al., 2004*), se planteó la hipótesis de que NR4A1 pudiera SUMOilarse, y que esta modificación regulara su función durante la muerte autofágica.

Una primera aproximación fue el análisis bioinformático para identificar posibles sitios de SUMOilación, identificándolos a partir de la búsqueda de secuencias consenso y considerando sitios conservados entre los miembros de la familia NR4A (*Figura 10; Zárraga, 2008*). Se identificaron tres sitios posibles de SUMOilación K102, K558 y K577; se construyeron mutantes en esos sitios sustituyendo las lisinas por argininas.

Se demostró que NR4A1 se SUMOila por SUMO-1 y SUMO-2/-3. A través de ensayos de inmunoprecipitación y western blot se demostró (*Figura 11*) que la SUMOilación por SUMO 2/3 se reduce en presencia de Gam1, un inhibidor general de la SUMOilación (*Sánchez-Carbente, en preparación*), comprobando la hipótesis inicial de su SUMOilación. Resultó entonces interesante estudiar si dicha modificación regula su función, ya sea alterando su estabilidad, su actividad transcripcional y/o su localización intracelular.

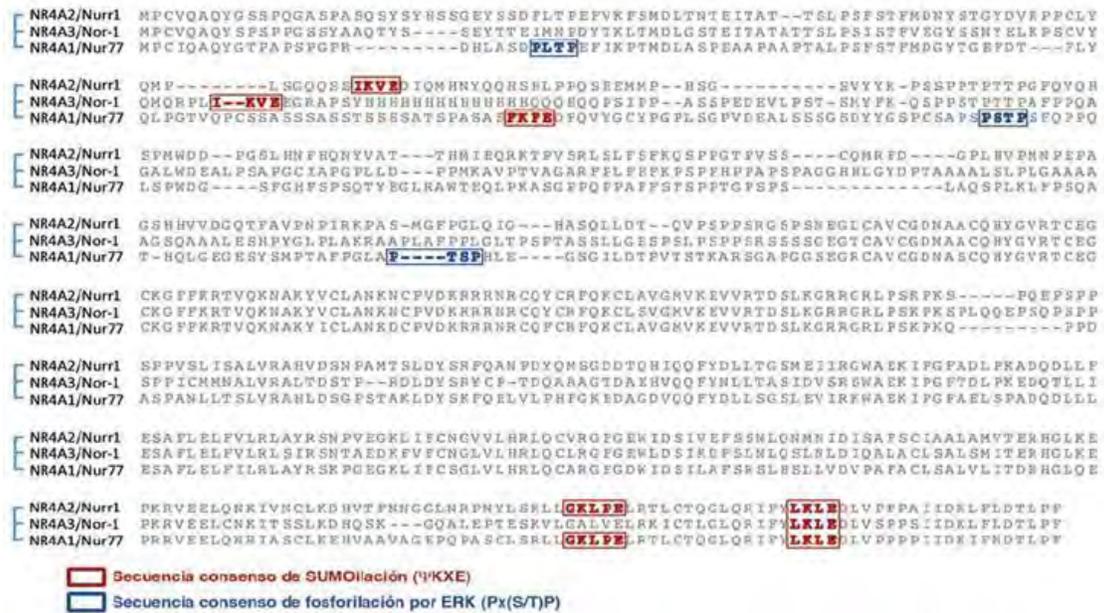


Figura 10. Posibles sitios de SUMOilación y fosforilación. Se muestran el alineamiento de las secuencias de los tres miembros de la familia NR4A. En los recuadros se resaltan los sitios de fosforilación (azul) y SUMOilación (rojo) elegidos para construir las mutantes utilizadas en este trabajo (Tomado de Zárraga, 2008).

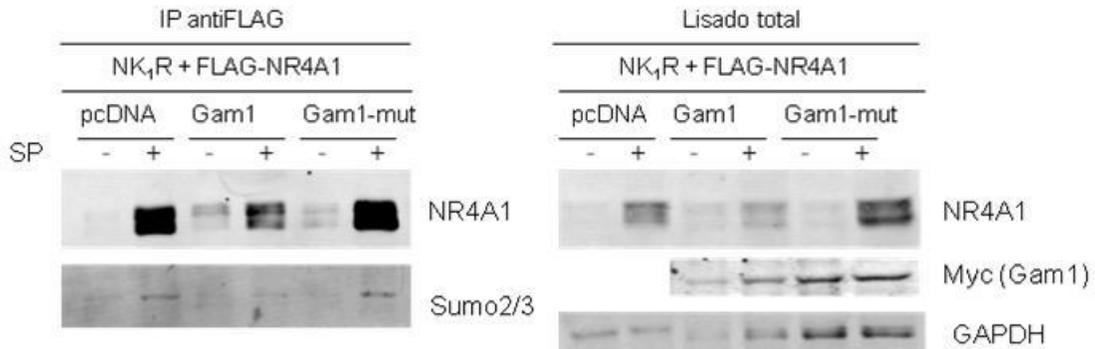


Figura 11. Sumoilación de NR4A1 por Sumo-2/3. Inmunoprecipitación de NR4A1 (-) y 3 horas posteriores a la inducción con SP (+), utilizando α -Flag. Se co-transfectó a la proteína Gam1 como inhibidor de la SUMOilación, en su presencia se observa una disminución en SUMO 2/3, que se recupera cuando se utiliza una mutante inactiva de Gam1 (Sánchez-Carbente, en preparación).

V. JUSTIFICACIÓN

El receptor nuclear NR4A1 participa en procesos celulares como crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte, así como en el metabolismo y el sistema inmune, sin embargo existe poca información sobre cómo es regulado para poder controlar el amplio espectro de funciones que tiene. En particular, consideramos que es importante estudiar su mecanismo de acción durante el modelo de muerte celular autofágica, ya que además de identificar cómo se regula NR4A1 mismo, podremos contribuir a entender la regulación de la autofagia y de la muerte celular.

Fallas en el mecanismo de regulación de la autofagia están implicadas en diferentes patologías, como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, desórdenes en el hígado y músculo, durante la invasión de patógenos, así como enfermedades asociadas a la vejez, por lo tanto identificar cómo se modula la autofagia permitirá entender aspectos básicos de la biología celular, así como proponer moléculas blanco para diseñar fármacos con potencial para aminorar los síntomas de las enfermedades mencionadas. Se ha observado que la resistencia a la quimioterapia de células cancerosas se debe en muchos casos a que tienen dañada la maquinaria apoptótica. De poder inducir la muerte autofágica, se podría atacar dichas células activando los diferentes programas de muerte simultáneamente.

Por todo lo anterior dilucidar el mecanismo molecular por el cual se regula la función de NR4A1 es de vital importancia para el conocimiento de la regulación de receptores nucleares, de la autofagia y de la muerte celular.

VI. HIPÓTESIS

Modificaciones post-traduccionales como la SUMOilación y la fosforilación regulan la actividad transcripcional, la localización intracelular y la estabilidad del receptor nuclear NR4A1.

VII. OBJETIVO GENERAL

Comparar la actividad transcripcional, localización intracelular y estabilidad del receptor nuclear NR4A1 silvestre con mutantes en sitios predichos de SUMOilación y fosforilación, en condiciones basales y durante la muerte celular por autofagia.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la actividad transcripcional de NR4A1 se altera al eliminar sitios predichos de SUMOilación, respecto a la proteína silvestre.
2. Comparar la actividad transcripcional de NR4A1 y las mutantes en sitios predichos de SUMOilación, durante la muerte autofagica.
3. Determinar si la localización intracelular de NR4A1 se altera en las mutantes en sitios predichos de SUMOilación y fosforilación.
4. Analizar si la estabilidad de NR4A1 endógeno se altera cuando se inhibe la SUMOilación durante la muerte autofágica.

VIII. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

BIOLOGÍA CELULAR

A. Cultivo Celular

- **Mantenimiento de la línea celular HEK293T** (*Human Embryonic Kidney*, Células embrionicas de riñón).

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 3ml de PBS 1x a temperatura ambiente, vertiéndolo suavemente por la pared del plato, no sobre las células.
3. Aspirar el PBS.
5. Agregar 1ml de tripsina 0.25% repartiéndolo por todo el plato, agitarlo ligeramente para favorecer la dispersión de la tripsina e incubar 3 minutos a 37°C.
6. Añadir 5ml de medio DMEM suplementado, previamente calentado a 37°C, y dispersar las células suavemente.
7. Transferir el disgregado a un tubo Falcon de 15ml (*Corning #430790*); tomar 10 μ l para realizar la cuantificación de densidad celular y transferirlos a un tubo eppendorf de 0.5 ml. Centrifugar el tubo Falcon 5 minutos a 1000 rpm.
8. Se elimina el sobrenadante cuidando no aspirar el botón celular, y se resuspende en el volumen de medio fresco necesario para obtener la concentración de células deseada. Incubar a 37°C y 5% de CO₂ en humedad.

Para el mantenimiento de la línea celular se siembran 1×10^6 células en un plato de 10cm (*Costar #430167*) en un volumen final de 10 ml de DMEM suplementado. Para el resto de los experimentos sembrar el número de células necesarias para cada caso.

- **Cuantificación de densidad celular**

Para la cuantificación celular se utiliza la cámara de Neubauer, que es un instrumento que permite realizar conteo de células en un medio líquido. La cámara consiste en un portaobjetos con una cuadrícula central de 3mm x 3mm de lado dividida en 9 cuadrados de 1mm cada uno. La cámara contiene pequeñas hendiduras que permiten cargar el líquido en el que se encuentran disueltas las células y mantenerlo por tensión superficial utilizando un cubreobjetos sobre la cámara. Una vez que el líquido se carga a la cámara se realiza el conteo del

número de células de los cuadrantes de la cámara. Finalmente se extrapola el número de células de acuerdo al volumen total que se tiene.

1. En el tubo eppendorf en donde se tienen los 10 μ l del disgregado de células agregar 10 μ l de azul de tripano, el cual permitirá identificar a las células muertas para evitar errores en el conteo, se colocan 10 μ l de esta mezcla en una cámara de Neubauer.
2. Se cuentan por lo menos 3 cuadrantes de la cámara, necesarios para que la suma sea de al menos 100 células totales. Un cuadrante equivale 0.1 μ l, se obtiene el promedio y se extrapola al volumen final en el que se resuspendió la pastilla. Multiplicar por 2, ya que este fue el factor de dilución.
3. Se resuspende la pastilla en el volumen de medio fresco necesario para la densidad celular que se requiere, ya sea para mantenimiento de la línea o experimento.

▪ **Congelación**

1. Se disgregan las células con tripsina 0.25%, como se menciona en el apartado anterior.
2. Resuspender la pastilla en el volumen requerido de medio DMEM con 40% de suero, para obtener una densidad celular de 2x10⁶ células/ml.
3. Agregar gradualmente un volumen igual de medio de congelación 2x (Anexo 1) al del volumen en que las células están resuspendidas. Mezclar cuidadosamente y hacer alícuotas de 1ml en crioviales (Corning #2028), previamente etiquetado con: tipo celular, fecha, densidad celular, número de pase y nombre de usuario.
4. Congelar a -70°C por 1 día y posteriormente transferir los viales a nitrógeno líquido.

▪ **Descongelación**

1. Incubar criovial por 1 o 2 minutos a 37°C en baño de agua.
2. Agregar inmediatamente 1ml de medio DMEM suplementado fresco y transferir el contenido a un tubo de 15ml (Corning #430790), aforar a 5ml con medio DMEM suplementado y precalentado a 37°C.
3. Mezclar un par de veces con pipeta y centrifugar 5 minutos a 1000 rpm.
4. Aspirar el sobrenadante, para retirar el medio de congelación cuidando no aspirar la pastilla, y resuspender en 10ml de medio DMEM suplementado fresco.
5. Sembrar en un plato de cultivo de 10cm.

6. Al día siguiente, cambiar el medio de cultivo por medio fresco.

B. Transfección transitoria con PEI (polietilenimina)

1. Sembrar células en el plato de cultivo y con el número de células necesarias para el experimento, un día antes de la transfección en medio suplementado sin antibióticos.

2. Para prepara el coctel de transfección se diluye:

DNA (1µg para caja de 6 pozos y 700ng para cajas de 24 pozos) en medio Optimem *Gibco #11058021* libre de suero (100µl para caja de 6 pozos y 50µl para caja de 24) en un tubo eppendorf de 0.5ml. Mezclar suavemente.

En un tubo independiente se diluye el PEI en Optimem (100µl para caja de 6 pozos y 50µl para caja de 24) con la cantidad necesaria dependiendo del número de pozos que se utilizará. Mezclar bien suavemente. La relación óptima de DNA:PEI es 2:6 (2µg DNA + 6µl PEI) para un pozo de 35 mm.

3. Agregar el PEI al DNA e inmediatamente mezclar bien.

4. La mezcla se deja 15 minutos a temperatura ambiente. Se retira la mitad de volumen del medio de cada pozo.

5. Se agrega la mezcla, por goteo, sobre las células y se agita suavemente el cultivo para dispersar la mezcla.

6. La solución de la transfección se cambia por medio DMEM suplementado sin antibióticos fresco 4 hrs después de la transfección.

Es importante que las células estén con un 80% de confluencia cuando se realiza la transfección ya que se obtendrá una mejor eficiencia de la misma.

C. Inducción de muerte celular por NK1R/SP

1. Se siembra el número de células necesario para cada experimento 24 hrs previas a la transfección (350 000 células para el plato de 6 pozos o 20 000 células para laminilla de 8 pozos).

2. Se transfecta transitoriamente con PEI la construcción que codifica para NK₁R, de acuerdo con el método anterior.

3. 24 hrs. posteriores a la transfección se agrega la Sustancia P disuelta agua, se diluye en medio y se deja actuar por 3 hrs.

La sustancia P se administra a una concentración 100 nM, la cual se disuelve en aproximadamente un 20% del volumen total de medio que contiene el pozo utilizado. **Nota:** La Sustancia P es inestable a temperatura ambiente y pH neutro, por lo que pierde efecto en un lapso de 5 minutos, por lo tanto su adición a las células debe ser rápida.

4. Se levantan las células y se realiza la lisis celular.

D. Inmunocitoquímica

1. Lavar con PBS 1X y fijar con paraformaldehído 4% / PBS 1X por 10 minutos.
2. Lavar con PBS 1X (500µl /pozo) y permeabilizar con 0.2% tritón X100 /PBS 1X por 10 minutos.
3. Lavar con PBS 1X y preincubar (bloqueo) 30 min con 4% suero de cabra en 4% BSA /PBS 1X (200 µl/pozo).
4. Lavar nuevamente con PBS 1X (3 veces) y agregar el anticuerpo primario necesario en 2% BSA/PBS por 3 hrs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (en cámara húmeda).
5. Lavar con PBS 1X (3 veces) y agregar el anticuerpo secundario en 2% BSA/PBS por 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar con PBS 1X y agregar tinción de núcleos Hoechst (rojo lejano) ó DAPI (azul) diluidos en PBS 1X 5-10 minutos. La dilución utilizada fue 1/7000.
7. Lavar con PBS 1X
8. Montar con cubre objetos, con una gota de medio de montaje por pozo (*VectaShield, Vector Laboratories #H-1000*). Eliminar burbujas y sellar con barniz transparente de uñas.

BIOLOGIA MOLECULAR

A. Plásmidos

Los plásmidos utilizados se obtuvieron de la purificación con el kit Qiagen® Plasmid Purification #12643.

B. Western Blot

▪ Obtención de extractos

1. Se siembran 5×10^5 células en platos de cultivo de 6 pozos con 2mL de medio (para los experimentos de estabilidad y expresión de NR4A1 silvestre y las mutantes)
2. De 18 a 22 hrs después se transfectan los plásmidos de interés (descrito en la sección de *Biología Celular*).
3. Las células se levantan 24hrs post transfección, en el caso de los experimentos de inducción el tratamiento con SP se realiza a las 21 hrs para levantarlas a las 24 hrs. Se retira el medio, se lavan con 500 μ L de PBS 1x frío y se despegan del plato, inmediatamente las células se colocan en tubos eppendorf y en hielo.
4. Centrifugar 5 minutos a 360 g a 4°C para eliminar restos del medio de cultivo.
5. Se realiza la lisis celular, de lo contrario las muestras se almacenan a -70 °C.

▪ Lisado celular

1. Las células son lisadas con el buffer RIPA (ANEXO 1), se agregan de 60 a 100 μ L del buffer dependiendo del tamaño de la pastilla de células. Se dejan 15 minutos en hielo.
2. Se rompe el DNA por sonicación (Misonix Sonicator, Ultrasonic processor Modelo S3000) programa establecido: amplitud 1, con 3 ciclos de 20 segundos de sonido por 20 segundos de pausa.
3. Se centrifugan a 13000 rpm por 10 minutos. El lisado final es transferido a tubos eppendorf limpios.

▪ Cuantificación de Proteína

Método de Bradford:

1. Se realiza una curva estándar utilizando albúmina en agua como referencia, de acuerdo a la siguiente tabla:

Solución de Bradford (μL)	Agua (μL)	Buffer de lisis (μL)	BSA ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
200	798	2	0
200	796	2	2
200	794	2	4
200	792	2	6
200	790	2	8
200	788	2	10
200	786	2	12

2. Se preparan las muestras que serán cuantificadas de acuerdo a la siguiente tabla:

Muestra	Solución de Bradford (μL)	Agua (μL)	Extracto de Proteína (μL)
1	200	798	2
2	200	798	2
n	200	798	2

3. Se mide la absorbancia a 595 nm tanto de la curva estándar como de las muestras. A partir de los datos de la curva estándar, se hace una regresión lineal y se obtienen los valores de la ecuación de la recta $y = mx + b$; donde: $x =$ proteína, $y =$ absorbancia, se interpolan los valores de las muestra y se determina la concentración de proteína de cada una.

4. Se realizan alícuotas de 40 μg y se almacenan a -70°C hasta su uso para evitar degradación de las proteínas por congelaciones sucesivas.

- **Electroforesis en gel desnaturante de acrilamida (SDS-PAGE, *Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis*).**

Los geles desnaturantes contienen, entre otros componentes, SDS, el cual es un detergente que permite separar las proteínas de acuerdo a su peso al conferirles una carga negativa parcial, lo cual facilita su migración a través del gel, hacia el cátodo. El porcentaje del gel está dado por el tamaño de la proteína, pues si la proteína es de un alto peso molecular necesita un porcentaje bajo de acrilamida para poder pasar a través de los poros que ésta forma al polimerizar; por el contrario, si la proteína es de bajo peso molecular,

el porcentaje del gel deberá ser mayor para retener a las proteínas grandes y permitir una mejor migración de las pequeñas.

1. Para todos los experimentos se utilizaron geles al 10% de acrilamida de acuerdo a la siguiente tabla:

	GEL SEPARADOR (ml)*	GEL CONCENTRADOR (ml)*
H ₂ O	4	1.12
Acrilamida 30%	3.3	0.33
Tris 1.5M pH 8.8	2.5	-----
Tris 0.5M pH 6.8	-----	0.5
SDS 10%	0.1	0.02
Amonio persulfato 10%	0.1	0.02
TEMED	0.004	0.002

* 10ml necesarios para preparar 2 geles de 1.0 mm

2. Mezclar las soluciones para el gel separador de acuerdo a las proporciones indicadas y verter la mezcla al cassette para geles de poliacrilamida. Agregar 500 µl de alcohol isopropílico sobre el gel, para alinearlos, y dejar polimerizar. Dejar una muestra de la mezcla de acrilamida en el recipiente donde se preparó, para comprobar la polimerización (toma 20 minutos, aproximadamente).

3. Una vez polimerizado el gel, drenar el alcohol isopropílico y retirar el exceso con papel absorbente, preparar el gel concentrador de acuerdo a las proporciones indicadas en la tabla anterior.

4. Con una micropipeta, verter el gel concentrador poco a poco sobre el gel separador, hasta casi llenar el cassette, y colocar el peine con cuidado de que no se formen burbujas. Esperar aproximadamente 15 minutos a que polimerice, de la misma manera que con el gel separador, dejar una muestra de la mezcla en el tubo donde se preparó, para comprobar la polimerización. Una vez con el gel concentrador, los geles pueden almacenarse en humedad y a 4°C hasta una semana.

5. Preparar las muestras mezclándolas con buffer de carga 5x (Anexo 1). La cantidad de proteína que se carga puede variar de acuerdo a la proteína que será detectada.

6. Ya preparadas las muestras, se incuban por 3 minutos a 95°C. Se incuban en hielo y finalmente se centrifuga brevemente para coleccionar la fracción de la muestra que se condensó. Cargar en el gel.

7. Llenar la cámara de electroforesis con buffer de corrida.

8. Cargar 40 µg de muestra y 3 µl del marcador de peso molecular para proteínas (*Page Ruler Fermentas # SM0671*).

9. Correr el gel a 150 V, hasta que el frente de corrida, indicado por el azul de bromofenol del buffer de carga llegue al final del gel. Aproximadamente 1:30 hrs.

- **Transferencia de proteínas de gel de poliacrilamida a membrana de PVDF**

1. Cortar la membrana de PVDF (Inmobillion-FL, Millipore #IPFL00010) del tamaño exacto del gel. Prehmedecerla en metanol al 100% para activarla. Desde este momento debe cuidarse que la membrana siempre se mantenga húmeda. Enjuagar todo material utilizado con agua destilada.

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

3. Armar el sándwich dentro del buffer de transferencia de la siguiente manera: esponja, papel Wathman, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, papel Wathman, esponja.

4. Presionar el sándwich con una pipeta de manera que se eliminen las burbujas formadas y colocar en la cámara de transferencia. El gel debe quedar orientado hacia el ánodo (negro) y la membrana de PVDF hacia el cátodo (rojo).

5. Llenar la cámara de transferencia con buffer de transferencia y un bloque de hielo dentro de la cámara cuando se corre a temperatura ambiente; correr durante 60 minutos a 100 V. Puede recurrirse a la transferencia en frío durante toda la noche de 14 a 20 V.

- **Detección de proteínas por medio de Western Blot (Revelado en Odyssey, detección por fluorescencia).**

1. Al término de la transferencia de proteínas a la membrana de PVDF, transferir la membrana a un tubo de 50 ml y agregar aproximadamente 5 ml de TBST, mantener en rotación durante varios minutos.

2. Bloquear la membrana con 5 ml de 3% leche/TBST por una hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C, en rotación.

3. Lavar la membrana con 5 ml TBST, 3 veces, 5 minutos por vez, en rotación.

4. Diluir el anticuerpo primario en 2 ml de TBST (según la recomendación técnica de la dilución óptima para cada anticuerpo), e incubar la membrana con el anticuerpo primario durante dos horas (monoclonal), o una hora (policlonal), a temperatura ambiente y en rotación. La incubación también puede llevarse a cabo toda la noche

a 4°C, dependiendo de las especificaciones de la hoja técnica del anticuerpo. Al terminar la incubación recuperar el anticuerpo primario y almacenar a 4° C para su re-uso. Diluciones utilizadas:

α- Tubulina 1/5000	ratón	Cell Signaling #3873
α- Nur77 1/2000	conejo	Cell Signaling #3960
α- Myc 1/350	ratón	Cell Signaling #2276
α- Flag 1/2000	ratón	Sigma F3165

5. Lavar la membrana con 5 ml TBST, 3 veces, 5 minutos por vez, en rotación.

6. Diluir el anticuerpo secundario correspondiente (Odyssey anti-mouse 700nm, u Odyssey anti-rabbit 700/800nm; el número indica la longitud de onda a la que es visible el fluoróforo) en TBST a una dilución 1/10 000 para ambos anticuerpos.

7. Incubar la membrana, protegiéndola de la luz por una hora y en rotación. Dejar la membrana incubándose por periodos de más de una hora no se recomienda, ya que incrementa el ruido de fondo y la inespecificidad.

8. Lavar la membrana nuevamente con 5 ml TBST 3 veces, 5 minutos por cada lavado, con TBST, en rotación y protegiendo a la membrana de la luz.

9. Enjuagar la membrana con PBS para eliminar el TBST residual, y escanear en el canal correspondiente, de acuerdo al fluoróforo acoplado al anticuerpo secundario utilizado (*Odyssey Infrared Imaging System, LI-COR*).

C. Ensayos de Actividad Transcripcional

▪ Obtención de extractos

1. Se siembran 1×10^5 células en platos de cultivo de 24 pozos con 500µL de medio de cultivo DMEM suplementado (Anexo1).

2. Aproximadamente 18 hrs. después se transfectan los plásmidos de interés (descrito en la sección de *Biología Celular*).

Para la medición de la actividad transcripcional se utilizó el Kit *Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega #E1980)* con el siguiente protocolo:

3. Se levantan las células 24 hrs. post- transfección, se retira el medio de cultivo y se lava cada uno de los pozos con 150µL de PBS 1x a temperatura ambiente. Se retira completamente el PBS 1x.

4. Se agregan 150µL de PLB (Buffer de lisis pasiva, por sus siglas en inglés) 1x a cada pozo y se realiza una lisis pasiva agitando los platos de cultivo por 15 minutos a temperatura ambiente.

5. Se colectan los extractos celulares y se transfieren a tubos eppendorf de 0.5 mL. A partir de este momento los lisados se mantienen en hielo. Si no se realiza el ensayo de actividad transcripcional inmediatamente, las muestras pueden ser congeladas en PLB a -80°C hasta por un mes.

▪ **Medición de la actividad *Luciferasa* y *Renilla***

6. En placa de 96 pozos de fondo oscuro (*Greiner # 655076*) se transfieren $20\mu\text{L}$ de cada uno de los lisados que serán analizados. Las muestras con el lisado sobrante se congelan a -20°C para su posterior cuantificación. La medición de la actividad se realiza con el lector de microplacas FLUOstar OMEGA (BMG LABTECH), utilizando el sistema de inyectores.

7. Se cargan los inyectores con $100\mu\text{L}$ de cada sustrato (LAR II y Stop & Glo[®] Reagent) por pozo.

8. Se miden las muestras en el modo de luminiscencia con el programa previamente configurado. El lector de microplacas inyecta $100\mu\text{L}$ del primer sustrato y mide la actividad de luciferasa, una vez finalizada la lectura inyecta el segundo sustrato y procede con la segunda medición.

9. Los datos son analizados en hoja de cálculo de Excel; la normalización de los datos se obtiene de dividir las lecturas obtenidas de la actividad de Luciferasa entre las lecturas obtenidas con la actividad de *Renilla*. La actividad transcripcional se determina como veces de inducción de la actividad de luciferasa con respecto a la actividad de la proteína silvestre, a partir de los datos obtenidos de por lo menos tres experimentos independientes.

ANALISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Todos los datos y análisis estadísticos fueron procesados en Excel y Prisma (GraphPad Prism 5). Se utilizó ANOVA como prueba estadística.

IX. RESULTADOS

- **Inducción de muerte celular autofágica por NK₁R/SP.**

Para inducir muerte celular autofágica en células no neuronales es necesario transfectar al receptor NK₁R, para que una vez que se exprese se active la muerte adicionando su ligando la Sustancia P. Para monitorear la eficiencia de la transfección, se inició transfectando un vector de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células HEK293T. En cada experimento se obtuvo una buena eficiencia de transfección (aproximadamente 80%). En la Figura 12A se muestran las células transfectadas, sin embargo la eficiencia no es tan evidente por deficiencias de la adquisición de la imagen.

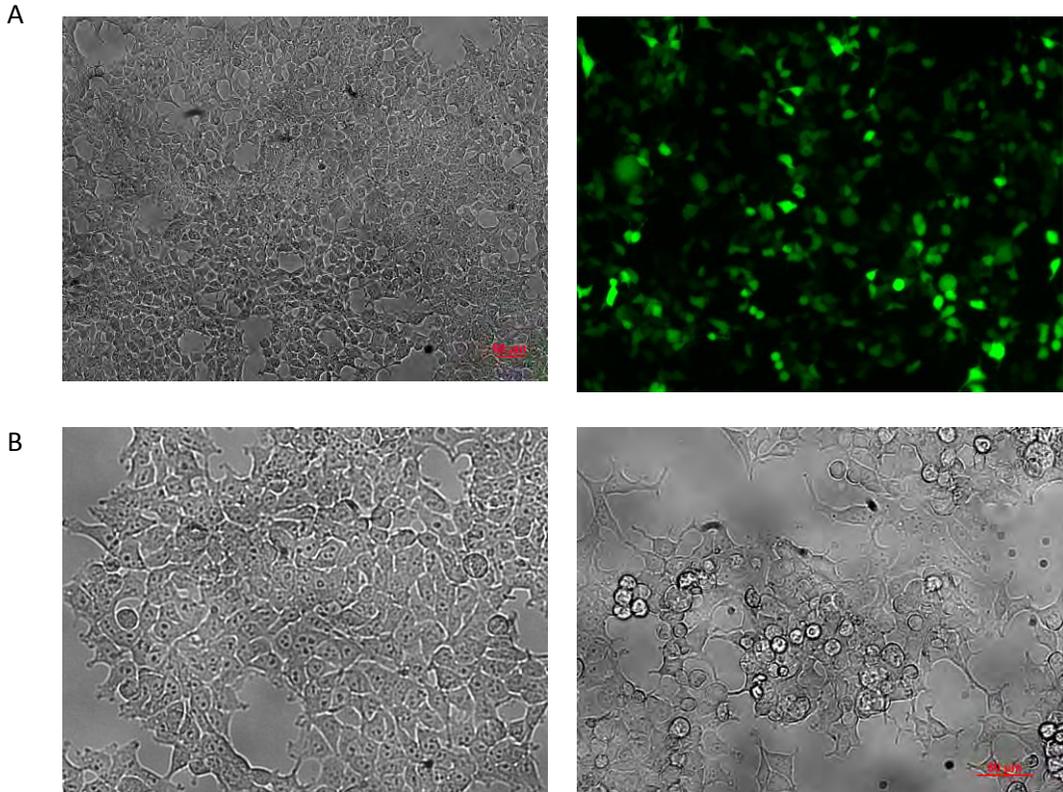


Figura 12. Inducción de muerte celular activando al receptor NK₁R con su ligando la Sustancia P. A. Eficiencia de transfección en campo claro (panel izquierdo), fluorescencia (panel derecho), se observa aproximadamente el 80% de las células transfectadas. B. Morfología de células transfectadas con el vector pcDNA (panel izquierdo), o bien con el vector de expresión de NK₁R (panel derecho) a las 24 horas posteriores al tratamiento con SP, observadas en campo claro. La barra representa 50 μ m.

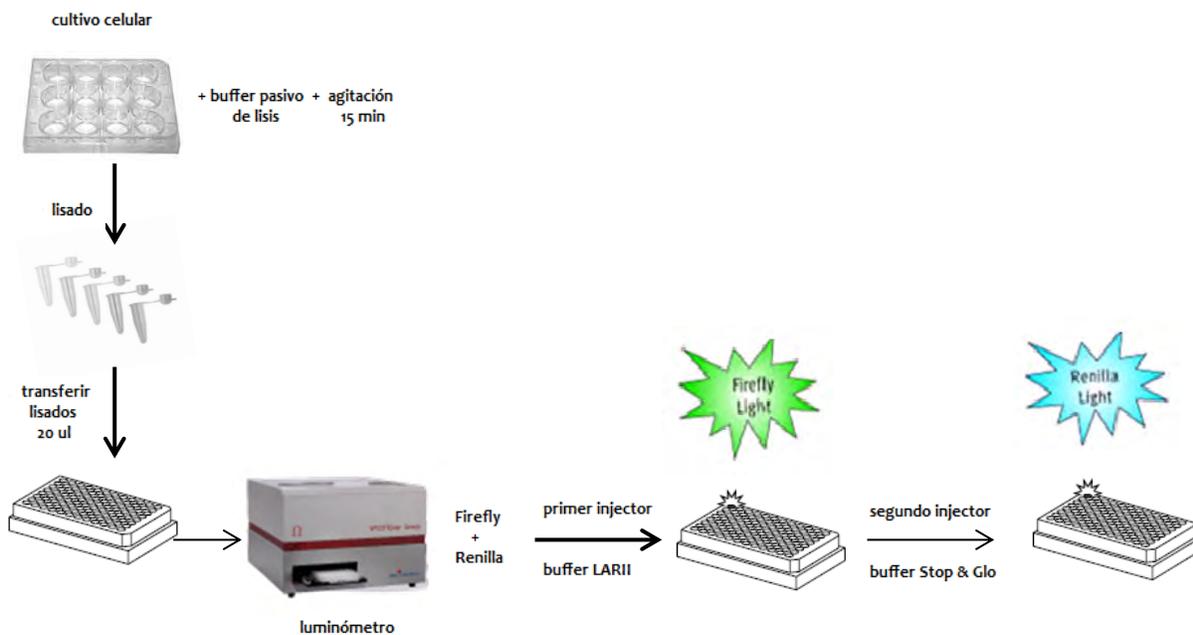
Para monitorear la muerte celular, después de transfectar el vector de expresión de NK₁R se trató a las células con SP por 24 horas y se observó un cambio en la morfología. En la figura 12B se observa la evidencia de muerte en las células que fueron transfectadas con NK₁R, mientras en el control, en el que se transfectó el vector vacío y se trató de igual manera con SP, no se presentaron dichos cambios.

- **La actividad transcripcional de NR4A1 puede ser regulada por SUMOilación.**

Para analizar la participación de la SUMOilación como regulador de la actividad transcripcional de NR4A1 se realizaron ensayos de transcripción expresando tanto a NR4A1 silvestre como a las cinco mutantes en los sitios predichos de SUMOilación disponibles: K102R, K558R, K577R, K102R K577R y K102R K558R K577R (descritas en los antecedentes). Se determinó la actividad transcripcional comparando la respuesta de tres construcciones reporteras que contienen, la secuencia codificante de luciferasa *Firefly (Photynus pyralis)* bajo el control del promotor mínimo de Pro-opiomelanocortina: a) sin elementos de respuesta (POMC-Luc), utilizado como control de especificidad de la actividad de NR4A1; b) con el elemento de respuesta al que se une NR4A1 como homodímero (NurRE-Luc) y c) con el elemento de respuesta al que se une NR4A1 como monómero (NBRE-Luc). Se realizaron combinaciones de tal manera que se transfectaron a NR4A1 silvestre y cada una de las mutantes con cada uno de los promotores. En todas las transfecciones se incluyó un plásmido que codifica para luciferasa *Renilla (Renilla reniformis)* bajo el control del promotor CMV, utilizado como control interno de la transfección, y con el cual se normalizaron los datos. Los ensayos de transcripción fueron realizados 24 horas posteriores a la transfección.

Los resultados demuestran que las mutantes mantienen un nivel de actividad transcripcional similar a la silvestre (Figura 12B), siendo casi nula la expresión basal cuando el promotor no tiene elemento de respuesta a NR4A1 (POMC). Cuando se incluyó el elemento de respuesta NBRE se observó un aumento en la actividad transcripcional entre 15 y 20 veces mayor que la basal, mientras que

A



B

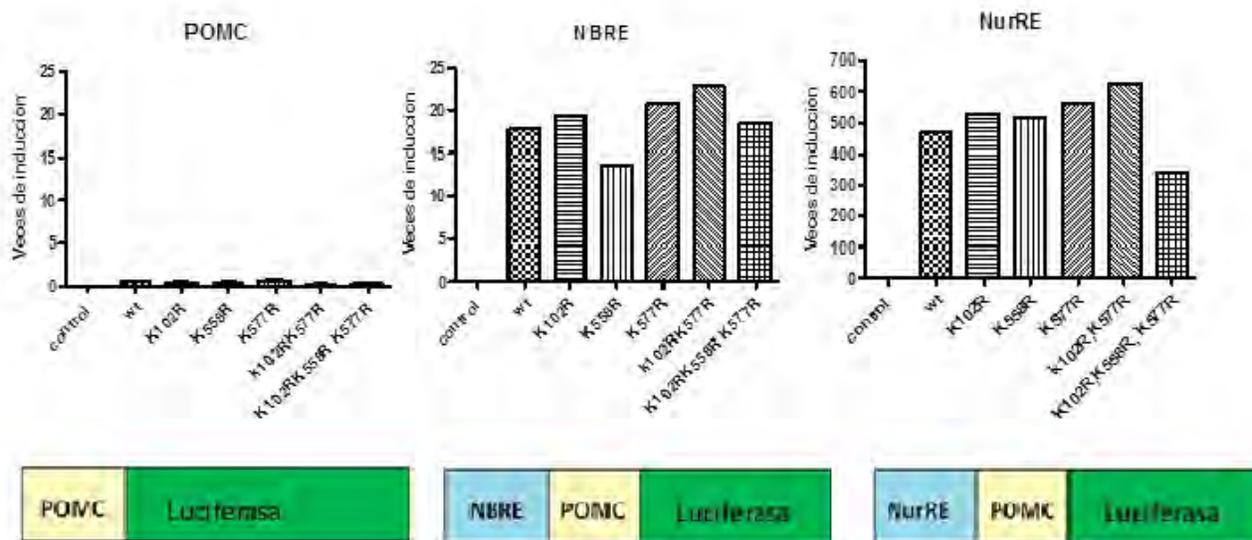


Figura 12. La actividad transcripcional de NR4A1 se mantiene en las mutantes en sitios predichos de sumoilación. A. Esquema de la metodología utilizada para cuantificar la actividad transcripcional. B. Se muestra la actividad transcripcional representada como veces de inducción respecto al nivel basal que se observó con el promotor mínimo POMC, o bien conteniendo los elementos NBRE y NurRE como se indica; debajo de cada gráfica se incluye un esquema de las construcciones utilizadas en cada caso. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes, con triplicados en cada uno N=2.

cuando se utilizó el elemento NurRE se observó un aumento entre 300 - 600 veces con respecto a la basal. Esta observación sugiere que NR4A1 actúa principalmente como homodímero.

Este resultado corresponde con datos publicados anteriormente (*Kurakula et al., 2011*), en donde la actividad transcripcional de NR4A1 es mayor con NurRE. Por lo tanto los experimentos posteriores se realizaron únicamente analizando la respuesta de dicho elemento.

Una vez que se observó que las mutantes mantienen actividad transcripcional cuando son sobre-expresadas en células proliferando, se prosiguió a comparar la actividad transcripcional durante la muerte celular inducida por NK₁R/SP, ya que podrían responder de manera diferente al haberse activado una señalización que cambie el estado de SUMOilación. Se transfectaron los mismos plásmidos utilizados en los experimentos previos incluyendo ahora en todas las combinaciones al receptor NK₁R, ya que las células utilizadas en este estudio no expresan naturalmente a este receptor.

Resulta interesante observar que la inducción de la muerte celular por NK₁R/SP incrementó la actividad transcripcional tanto de NR4A1 silvestre como en cada una de las mutantes (Figura 13B). Esta inducción no ocurrió con el promotor mínimo POMC, lo cual confirma la funcionalidad del modelo de muerte y la especificidad que tiene nuestro método para cuantificar la actividad de NR4A1. Por otro lado, la respuesta que se observó de las mutantes es que casi todas tienen una actividad transcripcional significativamente mayor que la silvestre. Dado que en resultados previos dentro de nuestro grupo de trabajo (*Sánchez-Carbente, 2011*) se observó que las mutantes tienen disminuido el grado de SUMOilación, estos resultados sugieren que la actividad transcripcional de NR4A1 se regula negativamente por SUMOilación. Resulta intrigante la respuesta de la doble mutante K102R K577R, ya que por el contrario, muestra una disminución de su actividad transcripcional (Figura 13A).

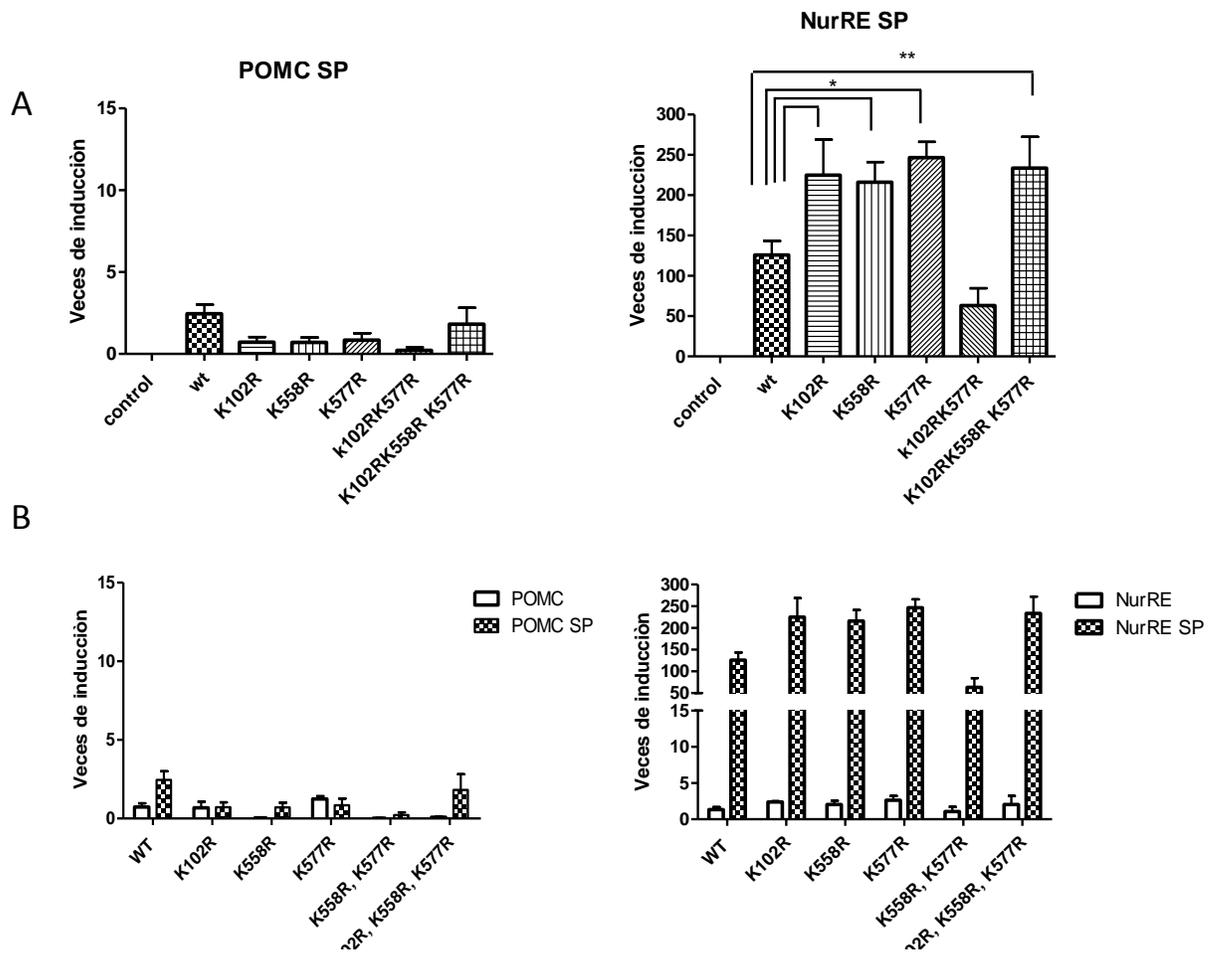


Figura 13. La disminución en la SUMOilación parece aumentar la actividad transcripcional de NR4A1. A. Actividad transcripcional de NR4A1 silvestre (wt) y las mutantes indicadas con el promotor mínimo POMC (panel izquierdo) o con el elemento NurRE (panel derecho), ambos inducidos con SP. N=3 **B.** Comparación de la actividad transcripcional con o sin SP tanto para POMC como para NurRE. Las barras representan el error estándar, estadística determinada por ANOVA *p < 0.5 ** p < 0.01 *** p < 0.001 Resultado de tres experimentos independientes con duplicados en cada uno N=3.

Para poder atribuirle directamente los cambios en la actividad transcripcional a las mutaciones en los sitios predichos de SUMOilación y no a la cantidad de proteína, era necesario comprobar que tanto NR4A1 silvestre como las mutantes se estuvieran expresando de igual forma dentro de las células. Se realizó un western blot para comparar los niveles de expresión de las diferentes mutantes; para la detección se utilizó al anticuerpo α -FLAG, debido a que las construcciones utilizadas contienen la secuencia FLAG para facilitar su detección (Zárraga, 2011) y al anticuerpo α -NR4A1 (Figura 14).

En los dos Western blot se comprobó que la abundancia de NR4A1 y las cinco mutantes utilizadas en los ensayos transcripcionales no correlaciona con los cambios observados en la actividad transcripcional. Si bien se observa una disminución en la doble mutante K102R K577R tratada con SP cuando se reveló contra α -Flag, también hay menos cantidad de la triple mutante, la cual presentó incluso mayor actividad transcripcional.

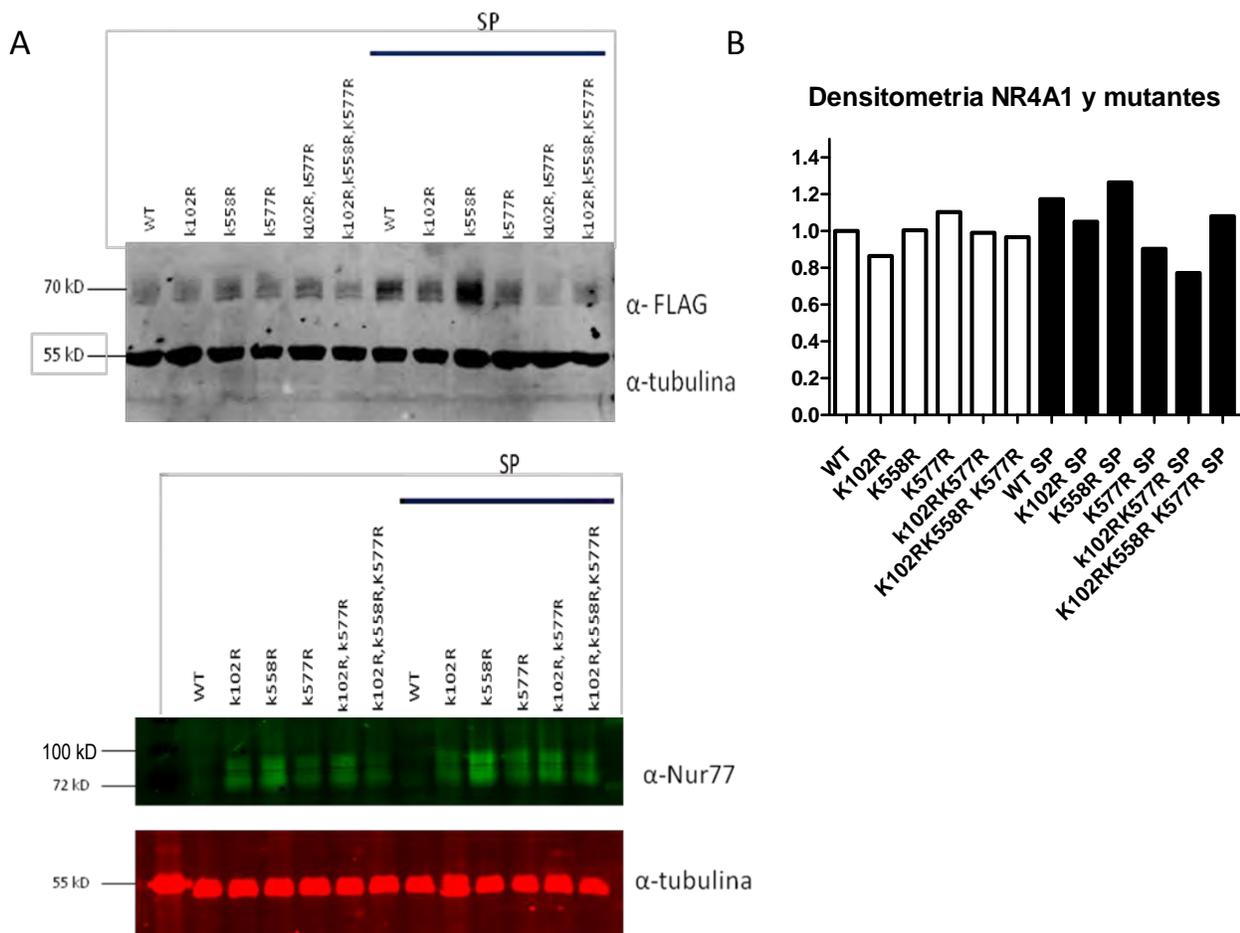


Figura 14. Expresión de NR4A1. Los niveles de expresión de las mutantes de NR4A1 no explican los cambios observados en su actividad transcripcional. A. Expresión de NR4A1 y mutantes con y sin SP revelado con α -Flag, se utilizó β -tubulina como control de carga. **B.** Densitometria del Western blot (panel A) graficado con unidades arbitrarias. **C.** Expresión de NR4A1 y mutantes con y sin SP, revelado con α -NR4A1.

Además, en ausencia de SP no se observó una disminución en la cantidad de proteína de la doble mutante, aunque sí se observó una disminución en su actividad transcripcional. Y en el caso de la detección con α -NR4A1 se observó la misma cantidad de proteína en todas las mutantes, en este experimento particular la silvestre no se presenta debido a un problema con el plásmido, que fue resuelto posteriormente. Estas observaciones sugieren que las diferencias en la actividad transcripcional no se deben a variaciones en la cantidad de proteína.

- **La localización intracelular de NR4A1 es predominantemente nuclear en las mutantes no SUMOilables, y citoplásmica en la mutante no fosforilable.**

La localización de NR4A1 es determinante para la regulación de sus diferentes funciones, por lo tanto es de gran importancia identificar en donde se encuentra y que determina esa localización, cuando la célula se enfrenta determinadas condiciones, como por ejemplo en la inducción de la muerte celular autofágica. Dado que la SUMOilación altera la localización de algunos factores de transcripción (*Hamard et al., 2007; Yang et al., 2009*) y considerando el antecedente de la SUMOilación de NR4A1, se realizaron inmunofluorescencias para determinar la localización de NR4A1 silvestre y de las mutantes en sitios predichos de SUMOilación.

Inicialmente el objetivo era identificar la localización de NR4A1 durante la inducción de la muerte autofágica. Para esto se identificaría a NR4A1 con el anticuerpo α -FLAG, ya que tanto las mutantes como la silvestre están fusionadas a esa etiqueta, para eliminar la señal de NR4A1 endógeno que se induce en respuesta a NK₁R/SP; sin embargo en los primeros resultados se observó un patrón diferente al reportado anteriormente para NR4A1 silvestre, debido a la posible inespecificidad del anticuerpo primario (Figura 15). Fue entonces necesario utilizar un anticuerpo contra NR4A1, con el cual no se puede distinguir la señal proveniente de la expresión endógena de la señal proveniente de las mutantes. Por lo tanto, se evaluó únicamente la localización de NR4A1 y sus mutantes sobre-expresadas en células proliferando (Figura 16).

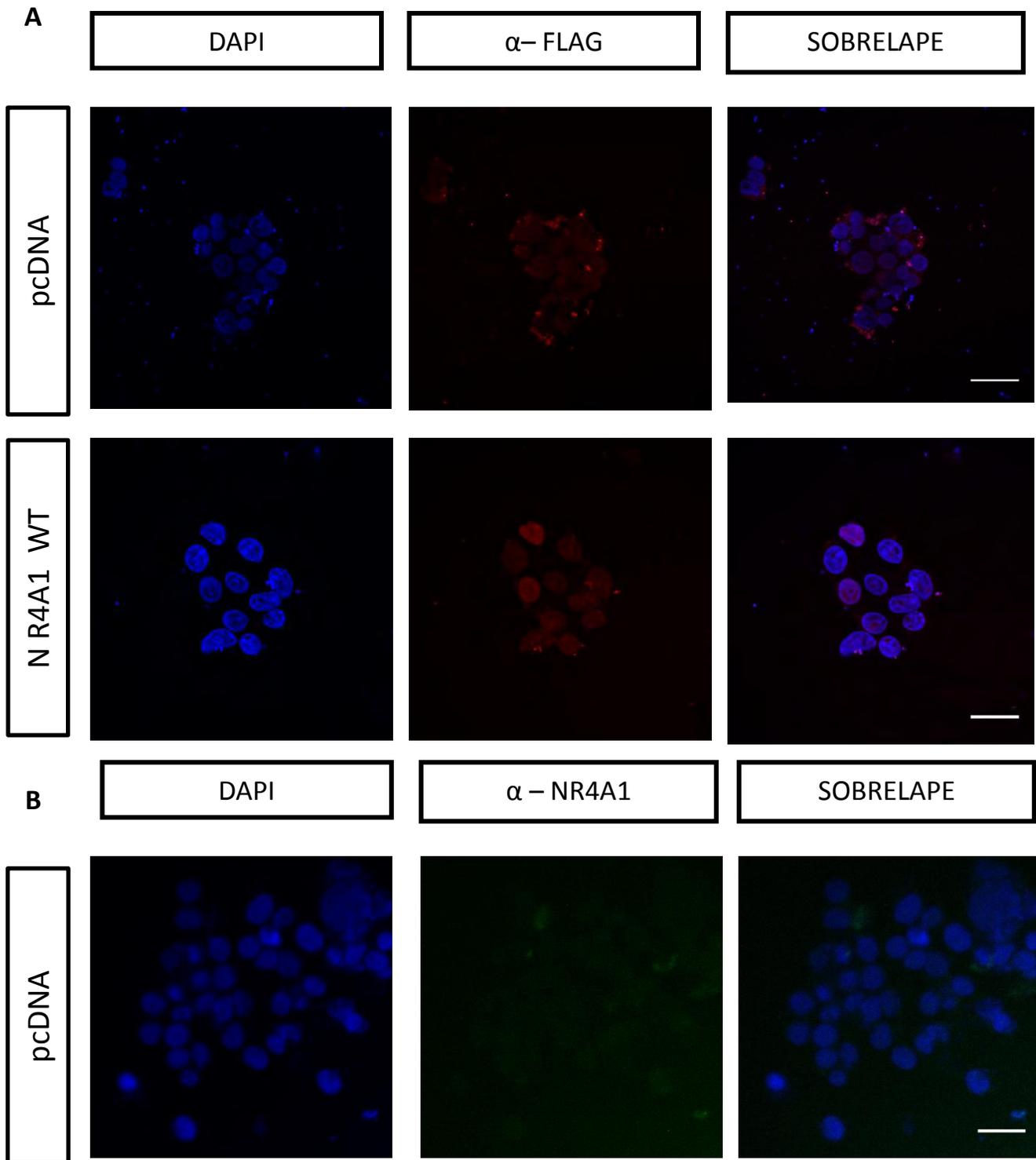
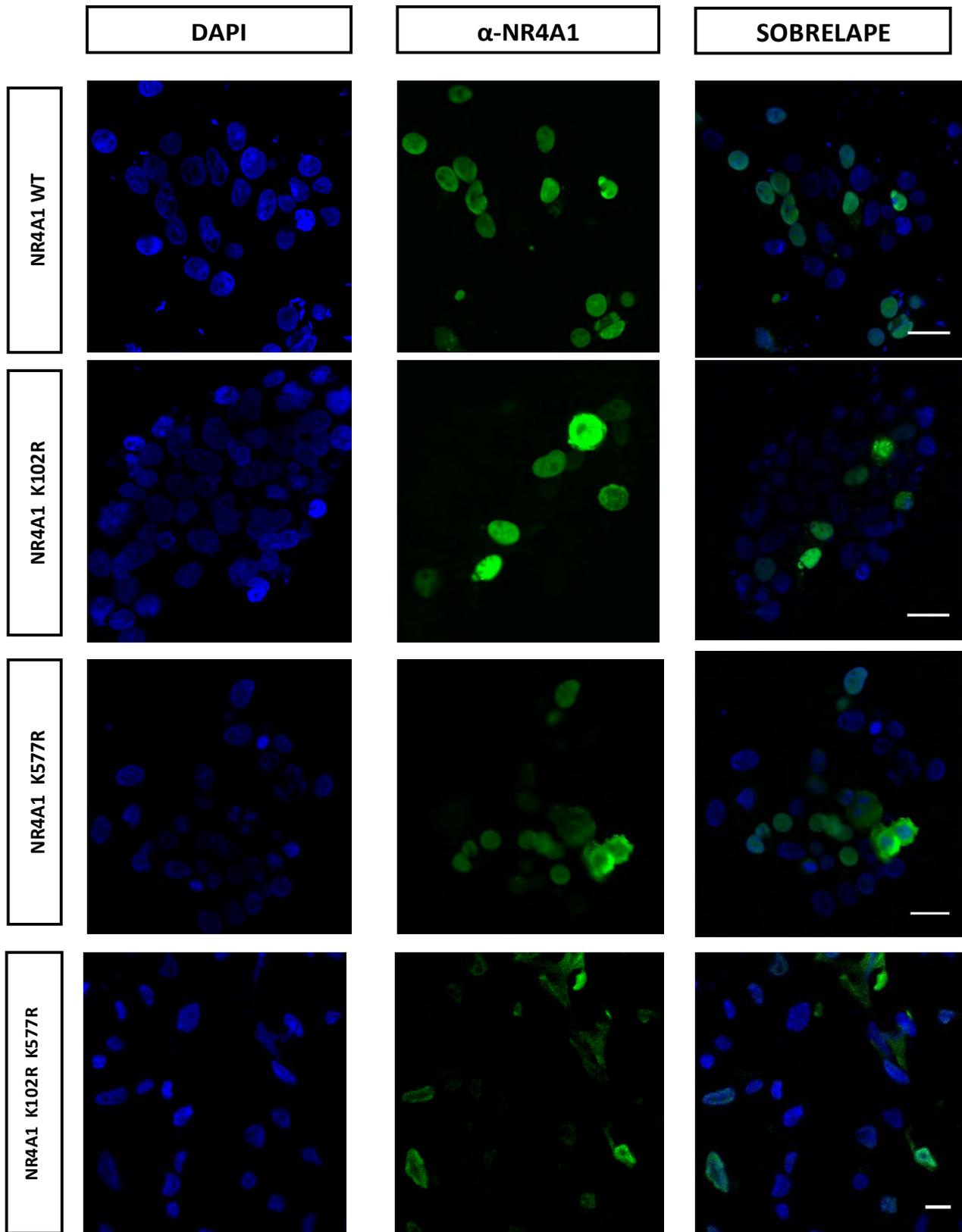


Figura 15. Inespecificidad de la identificación de α -FLAG. A. Inmunocitoquímicas en donde se observa la señal de α -Flag (rojo) para NR4A1 silvestre y la señal de un vector vacío (pcDNA) utilizado como control B. Señal obtenida con el vector vacío α -NR4A1 (verde), DAPI (azul). La barra representa 20 μ m.



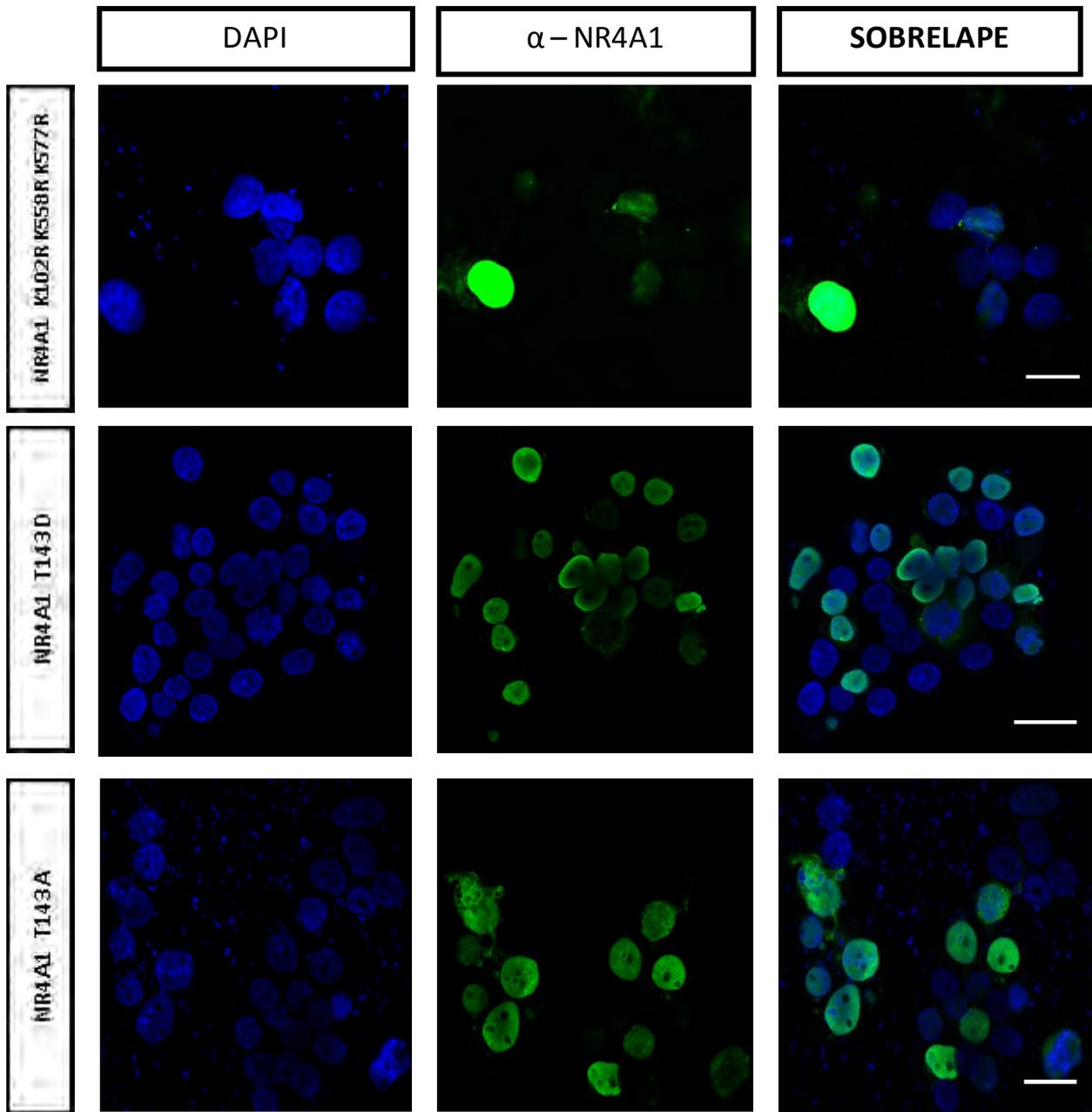


Figura 16. Localización de NR4A1 silvestre y mutantes en sumoilación y fosforilación. A. Inmunocitoquímicas en donde se observa la localización de NR4A1 (verde) y DAPI (azul). La barra representa 20 μ m.

A partir de estos experimentos se observó que en el 82% de las células NR4A1 silvestre se encuentra en el núcleo y solo en un 18% se localiza además en el citoplasma, comprobando los datos reportados anteriormente por *Gracida, 2007* en donde se observó un 86% en el núcleo y un 14% en citoplasma. En el caso de las mutantes, en las dos sencillas K102R y K577R así como en la triple, se observó de manera predominante la localización nuclear e incluso fue mayor que en el caso de la silvestre. Este resultado fue contrario a lo que se esperaba observar, suponiendo que al no ser modificadas fueran exportadas al citoplasma. Sin embargo, su retención en el núcleo podría explicar el aumento en su actividad transcripcional respecto a la silvestre. En la Figura 17 se resumen los porcentajes observados para cada mutante.

Debido a la interacción que puede ocurrir entre las modificaciones post-traduccionales y la posible regulación de la SUMOilación a través de la fosforilación, se realizaron inmunofluorescencias para dos mutantes en fosforilación, con el objetivo de observar si en este caso la localización de NR4A1 se modificaba.

Las mutantes utilizadas fueron: a) NR4A1 T143A, en la que fue sustituida la treonina 143 blanco de la fosforilación por ERK2, por una alanina, impidiendo así que la modificación ocurra; y b) NR4A1 T143D en la que se sustituyó la misma treonina por un residuo de ácido aspártico, el cual le confiere una carga negativa que simula la presencia del grupo fosfato y por lo tanto podría funcionar como una fosforilación constitutiva. En la mutante T143A se observó una distribución igual a la silvestre con 82% nuclear y 18% en citoplasma, mientras que en la T143D se observó un cambio en la distribución con el 63% nuclear y 37% en citoplasma (Figura 17).

% localización celular

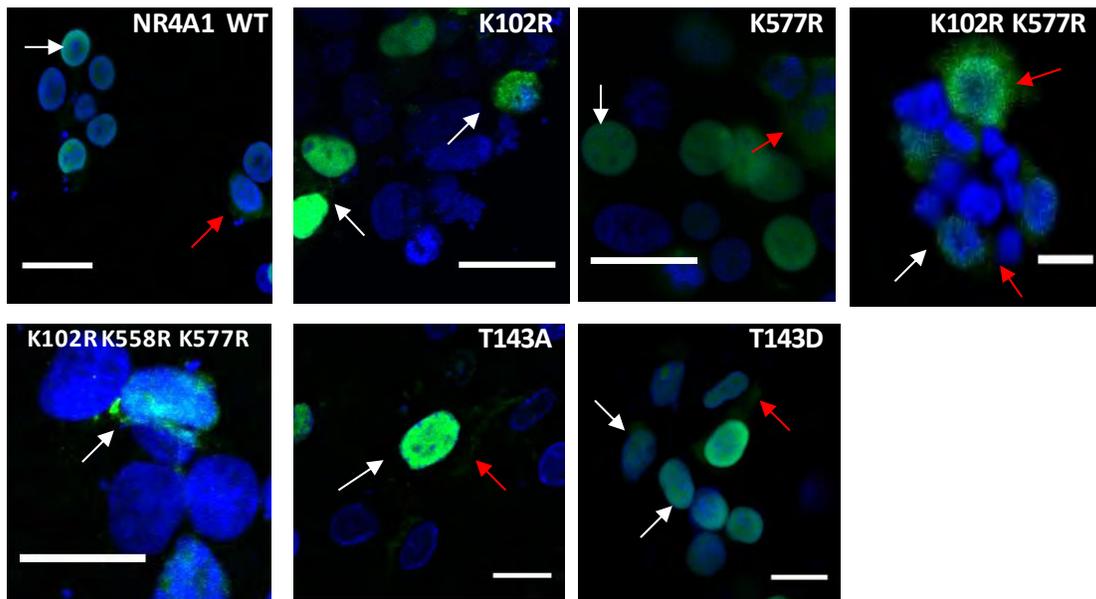
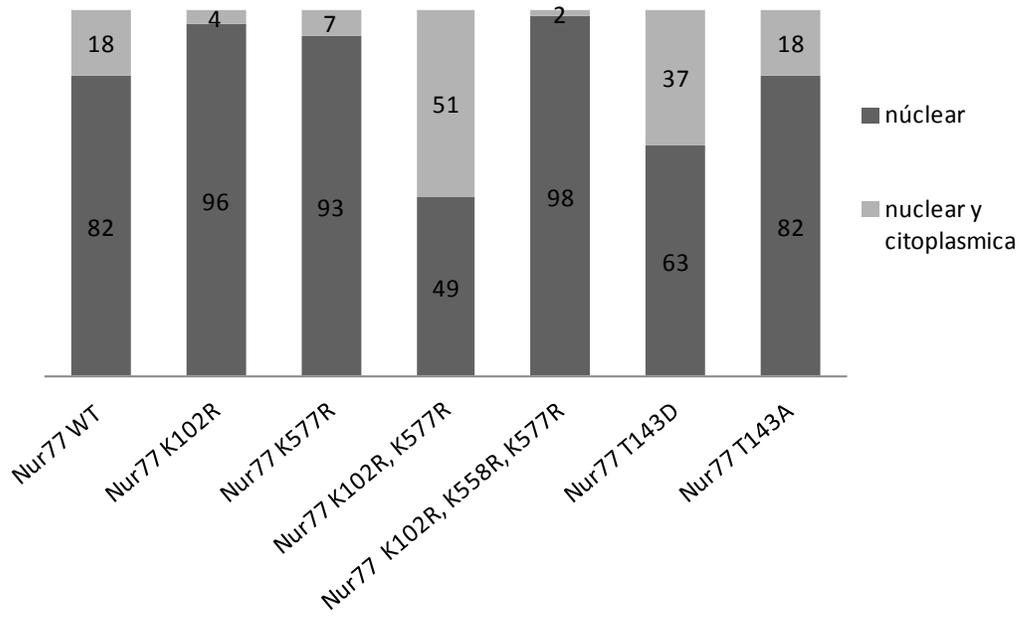


Figura 17. A. Cuantificación de la localización de NR4A1 y mutantes. La cuantificación es resultado de dos experimentos independientes contando 100 células en cada experimento. En la parte inferior se muestran acercamientos de la distribución de NR4A1 en cada mutante, las flechas señalan ejemplos de la localización citoplásmica (rojas) y nuclear (blancas) considerados en la cuantificación. Las barras representan 20 μm .

- **La vida media de NR4A1 no se altera cuando se inhibe la SUMOilación.**

Para determinar si el aumento en la cantidad de proteína de NR4A1 que se observa durante la inducción de la muerte se debe a un aumento en su estabilidad regulado por su grado de SUMOilación, se evaluó la vida media de NR4A1 endógeno durante la muerte autofágica a diferentes tiempos. Para poder determinar el tiempo que tarda en degradarse NR4A1, es necesario evitar la síntesis de nuevas moléculas, por lo que de manera simultánea otras células fueron tratadas con cicloheximida, un compuesto que inhibe la síntesis de proteínas porque interfiere con la actividad de peptidil transferasa de la subunidad 60S del ribosoma y por consecuencia evita el paso de elongación en la traducción. Se permitió la inducción de la expresión de NR4A1 durante 3 horas de exposición a SP, ya que es cuando NR4A1 muestra su nivel de expresión más alto. En ese momento se agregó la cicloheximida y se colectaron muestras a diferentes tiempos para determinar las horas que tarda NR4A1 en degradarse.

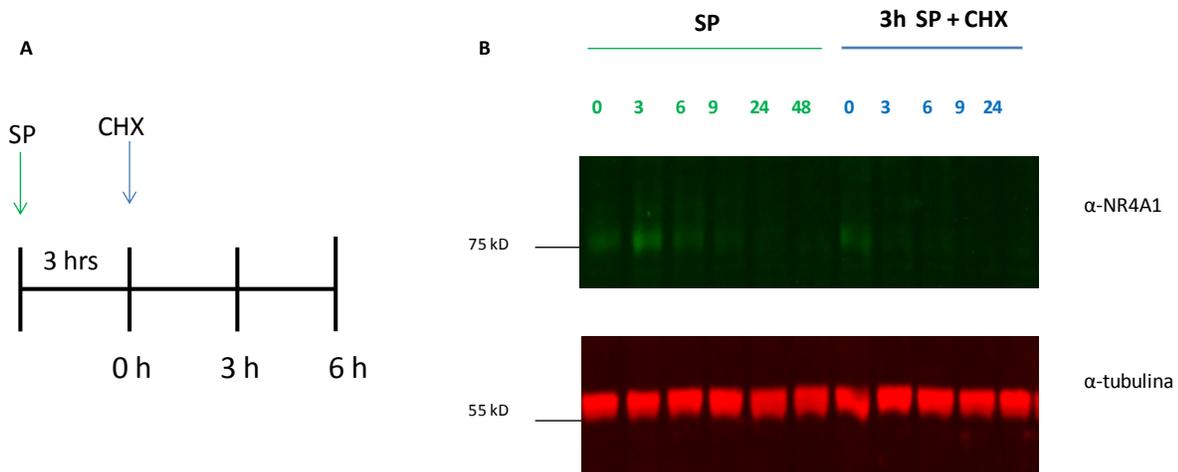


Figura 18. La vida medio de NR4A1 inducido por NK₁R/SP es de 3 hr aproximadamente. A. Esquema del experimento. Se trataron las células con SP por 3 h y después se añadió Cicloheximida (CHX). B. Las células fueron colectadas 3, 6, 9, 24 y 48 horas después de la Sustancia P (verde) y en los mismos tiempos después de agregar la CHX (azul). Los lisados fueron analizados por western blot, se utilizó α-tubulina como control de carga.

Se observó que ésta proteína tiene una vida media de aproximadamente 3 horas, tiempo en el que todavía se puede identificar aunque de forma escasa cuando está tratada con CHX. Sin embargo, la expresión es continua por varias horas después de la inducción con SP, ya que en ausencia de CHX aún está presente hasta las nueve horas, atribuyendo esta presencia a la síntesis de nueva proteína (Figura 18).

Una vez que se tenía determinada la vida media de NR4A1 endógeno, se realizó el mismo experimento inhibiendo ahora la SUMOilación. Para esto se utilizó a la proteína adenoviral Gam1 que promueve la degradación de la enzima E1 necesaria para el proceso de SUMOilación. Un vector de expresión de Gam1 fue transfectado junto con NK₁R en las células y 24 horas después fueron tratadas con SP por 3 horas antes de añadir la CHX, como en el experimento anterior. En esta ocasión, como se tenía la observación previa de la desaparición de NR4A1 alrededor de las 9 horas, los tiempos posteriores fueron eliminados. Los lisados celulares fueron analizados por Western blot y revelados contra NR4A1, α -tubulina como control de carga y Myc para identificar a Gam1 que tiene unido ese epítipo. La inducción de la expresión de NR4A1 no se vió inhibida en presencia de Gam1 comparada con el control (Figura 19B); se puede apreciar que cuando las células expresan Gam1 y son tratadas con CHX la expresión de NR4A1 es un poco mayor; además, las bandas de tamaño mayor (que podrían corresponder a la proteína SUMOilada) no se observan, comparadas a como se presentan en ausencia de Gam1, y se observa una leve disminución en la cantidad de proteína desde las 3 horas de incubación con CHX (Figura 19). Estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de NR4A1 no depende de la SUMOilación ya que no se observó cambio en su expresión, y que la SUMOilación participa en su estabilidad. Se comprueba la inhibición de la SUMOilación al no observar las bandas de NR4A1 modificadas cuando se encuentra presente Gam1.

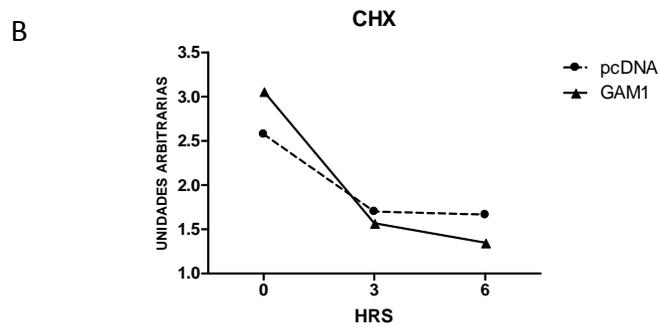
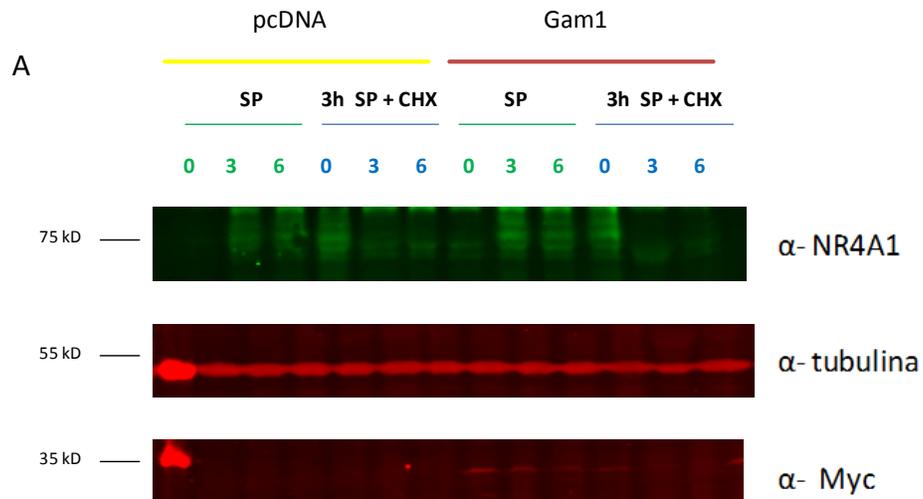


Figura 19. La vida media de NR4A1 se reduce moderadamente al inhibir la SUMOilación. A. Comparación de la expresión de NR4A1 en ausencia o presencia de Gam1 según se indica. Se trataron las células con SP y se tomaron las muestras en los tiempos indicados en verde, o bien se agregó CHX después de 3h de inducción con SP, colectando las muestras a los tiempos indicados; α -tubulina se detectó como control de carga y α -Myc se utilizó para identificar a Gam1. B. Comparación de la pendiente de degradación de NR4A1, graficando las densitometrias de la expresión de NR4A1 en presencia de CHX.

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Diversos factores transcripcionales son modificados por SUMOilación; la posibilidad de que el receptor NR4A1 fuera regulado de igual forma surgió al considerar que NR4A1 se estabiliza y se transloca del núcleo al citoplasma, se fosforila y que otros miembros de su familia como NR4A2 son modificados por SUMOilación (*Galleguillos et al., 2004*). Se planteó la hipótesis de que la SUMOilación de NR4A1 regulara su función durante la muerte autofágica, por lo que se analizó la actividad transcripcional y localización intracelular de cinco mutantes en sitios predichos de SUMOilación y dos mutantes en sitios de fosforilación, durante este tipo de muerte. Además, se estudió si la estabilidad de NR4A1 cambia al interferir con el proceso de SUMOilación.

- **La actividad transcripcional de NR4A1 puede ser regulada por SUMOilación.**

a) La actividad transcripcional presenta una gran diferencia en cuanto a la magnitud cuando se utiliza el elemento NurRE o NBRE.

El elemento NurRE se puede unir a NR4A1 en forma de homo o heterodímero, mientras que el elemento NBRE se une como monómero; por lo tanto es posible observar una actividad diferente de las mutantes. En este trabajo se observó un incremento de 20 – 30 veces en la actividad transcripcional entre NBRE Y NurRE, lo cual sugiere que NR4A1 funciona como dímero durante la muerte autofágica. Existe un reporte en dónde Nurr1, perteneciente a la misma familia de NR4A1, presenta una actividad diferencial dependiendo del elemento de respuesta que se utilice. En ese caso se analizó la actividad transcripcional de mutantes en SUMOilación utilizando el elemento NBRE para el que se observó una actividad menor comparada con el elemento DR5, al cual Nurr1 y NR4A1 también se unen formando un heterodímero con el RXR. Por lo tanto, es posible que se presente un comportamiento diferente de las mutantes si se utilizara al elemento NBRE (*Saijo, 2009*).

b) La actividad transcripcional de las mutantes es semejante a la de la silvestre en células proliferando.

Se observó un comportamiento semejante de la actividad transcripcional de las mutantes comparadas con la silvestre en células proliferando, por lo que pareciera que la SUMOilación no participa en su regulación. Sin embargo, estos resultados podrían deberse a que en células proliferando no existe la señalización necesaria para modificar post-traduccionamente a NR4A1, de forma que no se manifiestan diferencias entre las mutantes y la silvestre, posiblemente porque esta última tampoco estaría modificada.

c) La actividad transcripcional de casi todas las mutantes es mayor que la de la silvestre en células muriendo por autofagia.

Cuando se induce la muerte celular autofágica con NK₁R/SP, la actividad transcripcional aumenta de manera importante tanto de NR4A1 silvestre como de todas las mutantes, ya que se incrementa de 100 a 200 veces más que cuando no es inducida, comprobando que durante este proceso se da una señalización que regula la actividad transcripcional de NR4A1. Resulta interesante resaltar que en este caso casi todas las mutantes, excepto la doble K102R K577R, tienen una actividad mayor a la silvestre. La diferencia en la actividad de la doble mutante K102R K577R es significativamente menor comparándola tanto con la silvestre como con las otras mutantes evaluadas, lo cual mantiene la posibilidad de que alguno de esos sitios participe en la regulación por SUMOilación. Lo intrigante del comportamiento de la doble mutante, es que ninguna de las dos mutaciones sencillas K102R y K577R ni la triple que contiene esos dos sitios mutados, presentan una actividad transcripcional reducida, sino que tienen niveles de actividad similares entre ellas y mayores que la silvestre.

Los resultados observados en la actividad transcripcional son únicamente debidos a cambios en su regulación y no a una expresión diferencial de las mutantes, pues analizando la expresión de las cinco mutantes y la silvestre se presenta una expresión similar en casi todas. Únicamente se puede apreciar una disminución en la doble mutante cuando es inducida con SP, pero también hay menos cantidad de la triple mutante, la cual presentó incluso mayor actividad transcripcional. Además, en ausencia de SP no se observó una disminución en la cantidad de proteína de la doble mutante, aunque si se observó una disminución en su actividad transcripcional. Para la detección de la presencia de NR4A1 en las células se utilizó un anticuerpo α -FLAG, ya que como se mencionó anteriormente la silvestre y las cinco mutantes lo tienen insertado en su secuencia para facilitar su identificación. Sin embargo, también se realizó con un anticuerpo α -NR4A1 para asegurar que la expresión entre las mutantes fuera la misma y en ese caso también se detectaron niveles similares de expresión entre ellas (Figura 14C).

En resumen, los datos de este trabajo permiten sugerir una regulación de la actividad transcripcional de NR4A1 por SUMOilación. Existe la posibilidad de que existan otros sitios posibles de SUMOilación, además de los estudiados en este trabajo, ya que se ha observado que en algunos casos la regulación por SUMOilación está controlada por mas de un sitio (*Yang et al., 2012*).

- **La localización intracelular de NR4A1 es predominantemente nuclear en las mutantes no SUMOilables y citoplásmica en la mutante no fosforilable.**

Se ha comprobado que la SUMOilación es capaz de modular la localización subcelular de diversos factores de transcripción (*Hamard et al., 2007; Yang et al., 2009*). Por lo tanto se analizó que sucedía en el caso de NR4A1 cuando se impedía su SUMOilación. Se incluyó el análisis de dos mutantes en el sitio de fosforilación por ERK2: T143D y T143A, ya que se ha observado que en algunos casos existe una regulación entre estas dos modificaciones post traduccionales.

La localización de NR4A1 silvestre fue principalmente nuclear, observándose el 82% de las células en esta zona y el restante 18% citoplásmico. Resultó interesante descubrir que la localización nuclear fue mayor en las mismas mutantes que presentaron mayor actividad transcripcional, y que en el caso de la doble mutante se localizó en porcentajes similares tanto en citoplasma como en núcleo explicando la disminución de su actividad transcripcional al no estar disponible en el núcleo para realizarla. El comportamiento de la triple mutante sigue siendo interesante ya que tuvo una localización similar a las mutantes sencillas con una distribución casi totalmente nuclear, contrastando con la localización de la doble mutante. Por lo anterior se sugiere una regulación de la localización de NR4A1 mediante SUMOilación, u otro tipo de modificación en las lisinas K102 y K577.

Por otro lado la mutante no fosforilable T143A presentó una localización 82% nuclear y 14% citoplásmica, igual a la silvestre, mientras que en la mutante T143D que simula la fosforilación constitutiva presentó una localización 63% nuclear y 37% citoplásmica, siendo la mutante con la mayor distribución dentro del citoplasma. Este comportamiento es esperado si se toma en cuenta que NR4A1 hiperfosforilado permanecen en el citoplasma y cuando se encuentra menos fosforilado se localiza en núcleo. Por ejemplo en células PC12, NR4A1 es exportado del núcleo al citoplasma cuando se induce su fosforilación dependiente de NGF (factor de crecimiento nervioso) (Katagiri, 2000). La localización de NR4A1 corresponde con su nivel de actividad transcripcional, ya que la mutante T143A es transcripcionalmente mas activa que la silvestre, mientras que la mutante T143D no muestra este incremento en la actividad transcripcional Figura 20 (Zárraga 2009).

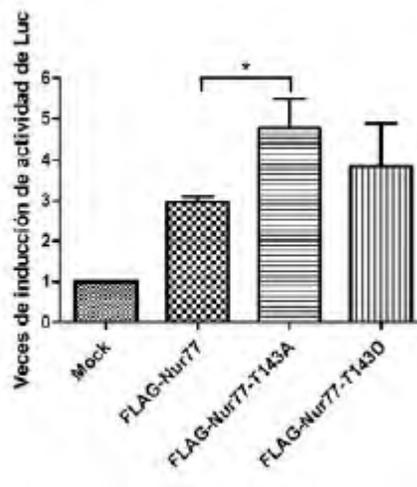


Figura 20. Actividad transcripcional de mutantes en fosforilación de NR4A1. Se presenta una diferencia significativa en la actividad de la mutante incapaz de ser fosforilada NR4A1 T143A comparada con la silvestre (Tomado de Zárraga, 2011).

Seria interesante analizar la localización tanto de NR4A1 silvestre como de las diferentes mutantes cuando son inducidas con SP en el modelo de muerte celular, para saber si se modifica su localización durante el mismo. En este trabajo no fue posible obtener dichos resultados ya que el anticuerpo disponible para detectar la etiqueta FLAG nos proporcionó una señal inespecífica; debido a la dificultad anterior queda como interrogante cual es el comportamiento de este receptor durante la muerte autofágica inducida por NK₁R/SP. Una opción para resolver éste problema sería utilizar interferentes que permitieran silenciar la proteína endógena, y de esta manera poder utilizar el anticuerpo contra NR4A1 y observar únicamente la localización de la proteína exógena.

- **La vida media de NR4A1 no se altera cuando se inhibe la SUMOilación.**

La SUMOilación puede regular la estabilización de las proteínas al competir con la ubiquitinación en las mismas lisinas. Para saber si la estabilidad de NR4A1 se regula por SUMOilación, en este trabajo primero se determinó la vida media de NR4A1 inducido por NK₁R/SP, que resultó ser de 3 horas aproximadamente. Posteriormente se comparó la vida media de NR4A1 cuando se inhibe la SUMOilación expresando la proteína adenoviral Gam1. Se observó un cambio sutil en la velocidad con que es degradado NR4A1, sugiriendo que la SUMOilación no regula significativamente la estabilidad de esta proteína. Estos resultados coinciden con experimentos que se realizaron en nuestro grupo de investigación en donde se observó que la vida media de la triple mutante K102R K558R K577R es similar a la silvestre (experimentos realizados por *Sánchez- Carbente, en preparación*); aunque es importante considerar que la triple mutante en SUMOilación no presenta una total abolición de la SUMOilación lo cual deja abierta la posibilidad de la participación de otros sitios de SUMOilación. Al menos en este caso la SUMOilación parece no regular la estabilidad de NR4A1.

Sin embargo de manera interesante parece que la expresión de NR4A1 es ligeramente mayor en la presencia de Gam1. Uno de los factores de transcripción que regula la expresión de NR4A1 es MEF2, que a su vez se regula por SUMOilación (*Riquelme, 2006*). Podría ser entonces que el efecto que observamos en el aumento en la expresión de NR4A1 se deba a un efecto en la SUMOilación de este

factor de transcripción. De igual manera es importante mencionar que MEF2 presenta la interacción fosforilación-SUMOilación en la regulación de su actividad (*Grégoire, 2006*), representando un ejemplo de este tipo de interacciones.

XI. CONCLUSIONES

- La actividad transcripcional tanto de NR4A1 silvestre como de las mutantes en sitios SUMOilables aumenta cuando se induce la muerte celular autofágica.
- La SUMOilación parece regular la actividad transcripcional de NR4A1 ya que las mutantes en sitios SUMOilables presentan una mayor actividad transcripcional comparadas con la silvestre, con excepción de la mutante doble NR4A1 K102R K577R.
- La SUMOilación participa en la regulación de la localización celular de NR4A1, ya que todas las mutantes en los sitios predichos de SUMOilación permanecen en el núcleo, a excepción de la doble mutante K102R K577R que se localiza principalmente en citoplasma.
- La fosforilación puede tener una función regulatoria sobre NR4A1, puesto que la mutante T143A permanece en el núcleo y la mutante T143D en el citoplasma.
- La SUMOilación regula moderadamente la estabilidad del receptor NR4A1.

XII. PERSPECTIVAS

- Investigar el posible papel regulador de los sitios K102R, K577R en NR4A1 ya sea por su posible interacción con la fosforilación, o por la participación de otra modificación postraduccional como la acetilación.
- Identificar si existe un sitio de SUMOilación-fosforilación dentro de la secuencia de NR4A1 por análisis bioinformáticos. En caso de presentarse analizar si tiene función dentro de su regulación.
- Analizar la localización de NR4A1 y las mutantes en sitios predichos de SUMOilación cuando son inducidos con SP, utilizando interferentes que permitan inhibir la transcripción de NR4A1 endógeno.

XIII. REFERENCIAS

- Amelio I, Melino G, Knight RA. 2011 **Cell death pathology: Cross-talk with autophagy and its clinical implications.** Biochem Biophys Res Commun.;414(2):277-81.
- Boggio R, Colombo R, Hay RT, Draetta GF, Chiocca S. 2004 **A mechanism for inhibiting the SUMO pathway.** Mol Cell.; 16(4):549-61.
- Bossis G, Melchior F. 2006. **SUMO: regulating the regulator.** Cell Div. 29;1:13.
- Bouras T, Fu M, Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, Hay RT, Gu W, Pestell RG. 2005. **SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1.** J Biol Chem. 280(11):10264-76.
- Bouzas-Rodríguez J, Zárraga-Granados G, Sánchez-Carbente Mdel R, Rodríguez-Valentín R, Gracida X, Anell-Rendón D, Covarrubias L, Castro-Obregón S. 2012. **The nuclear receptor NR4A1 induces a form of cell death dependent on autophagy in mammalian cells.** PLoS One. 7(10):e46422.
- Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Fröhwein U, Schulte-Hermann R. 2000. **Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?** Ann N Y Acad Sci. 926:1-12.
- Bursch, W. 2004 **Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades.** FEMS Yeast Res. 5(2):101-10
- Campos-Melo D, Galleguillos D, Sánchez N, Gysling K, Andrés ME. 2013. **Nur transcription factors in stress and addiction.** Front Mol Neurosci. 2;6:44.
- Castro-Obregón S, Del Rio G, Chen SF, Swanson RA, Frankowski H, Rao RV, Stoka V, Vesce S, Nicholls DG, Bredesen DE. 2002 **A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death.** Cell Death Differ. 9(8):807-17.
- Castro-Obregón S, Rao RV, Del Rio G, Chen SF, Poksay KS, Rabizadeh S, Vesce S, Zhang XK, Swanson RA, Bredesen DE. 2004. **Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77.** J Biol Chem. 23;279(17):17543-53.
- Cheung ZH, Ip NY, 2011. **Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives.** J Neurochem. Aug;118(3):317-25.
- Clarke PG. 1990. **Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms.** Anat Embryol (Berl). 181(3):195-213.
- Cuervo AM. 2004 **Autophagy: in sickness and in health.** Trends Cell Biol.;14(2):70-7.
- Dohmen RJ. 2004 **SUMO protein modification.** Biochimica et Biophysica Acta 1695, 113-131.
- Fu Y, Luo L, Luo N, Zhu X, Garvey WT. 2007. **NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance.** J Biol Chem. 282(43):31525-33.

- Galleguillos D, Vecchiola A, Fuentealba JA, Ojeda V, Alvarez K, Gómez A, Andrés ME. 2004. **PIASy Represses the Transcriptional Activation Induced by the Nuclear Receptor Nur1**. The Journal of Biological Chemistry. 273 (3) 2005-2011.
- Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G. 2008 **To Die or Not do Die: That is the Autophagic Question**. Curr. Mol. Med. 8, 78-91.
- Gareau JR, Lima CD. 2010. **The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition**. Nat Rev Mol Cell Biol. 11(12):861-71.
- Geiss-Friedlander, R; Melchior, F. 2007. **Concepts in sumoylation: a decade on**. Nat Rev Mol Cell Biol. 8(12):947-56.
- Grégoire S, Tremblay AM, Xiao L, Yang Q, Ma K, Nie J, Mao Z, Wu Z, Giguère V, Yang XJ. 2006. **Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation**. J Biol Chem. 17;281(7):4423-33.
- Hamard PJ, Boyer-Guittaut M, Camuzeaux B, Dujardin D, Hauss C, Oelgeschläger T, Vigneron M, Kedinger C, Chatton B. 2007. **Sumoylation delays the ATF7 transcription factor subcellular localization and inhibits its transcriptional activity**. Nucleic Acids Res. 35(4):1134-44.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L. 2006. **PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification**. Proc Natl Acad Sci U S A ;103(1):45-50.
- Hsu HC, Zhou T, Mountz JD. 2004. **Nur77 family of nuclear hormone receptors** Curr Drug Targets Inflamm Allergy. (4):413-23.
- Jacobs CM, Boldingh KA, Slagsvold HH, Thoresen GH, Paulsen RE. 2004. **ERK2 prohibits apoptosis-induced subcellular translocation of orphan nuclear receptor NGFI-B/TR3**. J Biol Chem. 279(48):50097-101.
- Jia K, Levine B. 2007. **Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in C. elegans**. Autophagy. 3(6):597-9.
- Johnson E. 2004 **Protein Modification by SUMO**. Annu. Rev. Biochem. 73:355-82.
- Kang SA, Na H, Kang HJ, Kim SH, Lee MH, Lee MO. 2004. **Regulation of Nur77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1**. Biochem Pharmacol. 80(6):867-73.
- Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, Guroff G. 2000. **Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B**. Nat Cell Biol. (7):435-40.
- Kenyon CJ. 2010. **The genetics of ageing**. Nature. 464(7288):504-12.
- Kolluri SK, Bruey-Sedano N, Cao X, Lin B, Lin F, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. 2003. **Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEK1 in lung cancer cells**. Mol Cell Biol. (23):8651-67.
- Komatsu M, Ueno T, Waguri S, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. 2007. **Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons**. Cell Death Differ. 14(5):887-94.
- Kurakula K, van der Wal E, Geerts D, van Tiel CM, de Vries CJ. **FHL2 protein is a novel co-repressor of nuclear receptor Nur77**. J Biol Chem. 2011 Dec 30;286(52):44336-43.

- Łazarczyk M, Matyja E, Lipkowski A. 2007. **Substance P and its receptors -- a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies (mini-review)**. *Folia Neuropathol.* 45(3):99-107.
- Li X, Ke N, Sundaram R, Wong-Staal F. 2006. **NR4A1, 2, 3- an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis**. *Histol. Histopathol* 21: 533-540.
- Majno G, Joris I. 1995. **Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death**. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1):3-15.
- Malewicz M, Kadkhodaei B, Kee N, Volakakis N, Hellman U, Viktorsson K, Leung CY, Chen B, Lewensohn R, van Gent DC, Chen DJ, Perlmann T. 2011. **Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair**. *Genes Dev.* 25(19):2031-40.
- Masuyama N, Oishi K, Mori Y, Ueno T, Takahama Y, Gotoh Y. 2001. **Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis**. *J Biol Chem.* 276(35):32799-805.
- Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. 1997. **App1p a novel protein kinase required for autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae***. *Gene* 192, 245-250.
- Maxwell MA, Muscat GE. 2006. **The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles**. *Nucl Recept Signal.*
- Mohan HM, Aherne CM, Rogers AC, Baird AW, Winter DC, Murphy EP. 2012. **Molecular pathways: the role of NR4A orphan nuclear receptors in cancer**. *Clin Cancer Res.*15;18(12):3223-8.
- Moll UM, Marchenko N, Zhang XK. 2006. **p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction**. *Oncogene* 25(34):4725-43.
- Münz C. 2010. **Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore?**. *Curr Opin Immunol.* 22(1):89-93.
- Nilsson P, Loganathan K, Sekiguchi M, Matsuba Y, Hui K, Tsubuki S, Tanaka M, Iwata N, Saito T, Saido TC. 2013. **Aβ secretion and plaque formation depend on autophagy**. *Cell Rep.* 5(1):61-9.
- Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, Mautner J. 2003. **Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy**. *Eur J Immunol.* 33(5):1250-9.
- Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P. 2006. **NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism**. *Nat Med.* 12(9):1048-55.
- Platini, F.; Pérez-Tomás, R; Ambrosio, S & Tessitore, L. 2010. **Understanding Autophagy in Cell Death Control**. *Current Pharmaceutical Design* 16, 101-113.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. 2003. **Necrosis: a specific form of programmed cell death?** *Exp Cell Res.*;283(1):1-16.
- Rami A. 2009 **Autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary?**. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35, 4449-461.
- Riquelme C, Barthel KK, Liu X. 2006. **SUMO-1 modification of MEF2A regulates its transcriptional activity**. *J Cell Mol Med.* 10(1):132-44.

- Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. 2011. **Autophagy and aging**. Cell. 146(5):682-95.
- Saunders LR, Verdin E. 2009. **Cell biology. Stress response and aging**. Science. 323(5917):1021-2.
- Seeler JS, Dejean A. 2003. **Nuclear and unclear functions of SUMO**. Nat Rev Mol Cell Biol. 4(9):690-9.
- Simonsen A, Tooze SA. 2009. **Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes**. J Cell Biol. 186(6):773-82.
- Slagsvold HH, Østvold AC, Fallgren AB, Paulsen RE. 2002. **Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2**. Biochem Biophys Res Commun. 15;291(5):1146.
- Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. 2012. **Autophagy and disease: always two sides to a problem**. J Pathol. 226(2):255-73.
- Suzuki S, Suzuki N, Mirtsos C, Horacek T, Lye E, Noh SK, Ho A, Bouchard D, Mak TW, Yeh WC. 2003. **Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling**. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(14):8276-80.
- Wilkinson KA, Henley JM. 2010. **Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation**. Biochem J. 13;428(2):133-45.
- Wong ASL, Cheung ZH, Ip NY. 2011. **Molecular machinery of macroautophagy and its deregulation in diseases**. Bioch. Et Bioph Acta 1812, 1490-1497.
- Xie Z, Klionsky DJ. 2007. **Autophagosome formation: core machinery and adaptations**. Nat Cell Biol. 9(10):1102-9.
- Yang WH, Heaton JH, Brevig H, Mukherjee S, Iñiguez-Lluhí JA, Hammer GD. 2009. **SUMOylation inhibits SF-1 activity by reducing CDK7-mediated serine 203 phosphorylation**. Mol Cell Biol. 29(3):613-25.
- Yang Z, Klionsky DJ. 2010. **Eaten alive: a history of macroautophagy**. Nat Cell Biol. Sep; 12(9):814-22.
- Yang Z, Klionsky DJ. 2010. **Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation**. Curr Opin Cell Biol. Apr;22(2):124-31.
- Yang F, Yao Y, Jiang Y, Lu L, Ma Y, Dai W. 2012. **Sumoylation is important for stability, subcellular localization, and transcriptional activity of SALL4, an essential stem cell transcription factor**. J Biol Chem 9;287(46):38600-8.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Näslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA. 2005. **Macroautophagy: a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease**. J Cell Biol. 171(1):87-98.
- Zárraga, G. 2008. **Modificaciones postraduccionales del receptor nuclear Nur77**. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México pp 94.
- Zárraga, G. 2011 **Estudio de la muerte celular autofágica mediada por el receptor nuclear Nur77**. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM. México pp. 88.
- Zhan YY, Chen Y, Zhang Q, Zhuang JJ, Tian M, Chen HZ, Zhang LR, Zhang HK, He JP, Wang WJ, Wu R, Wang Y, Shi C, Yang K, Li AZ, Xin YZ, Li TY, Yang JY, Zheng ZH, Yu CD, Lin SC, Chang C, Huang PQ, Lin T, Wu Q. 2012.

The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat Chem Biol.* 8(11):897-904.

- Zhang C, Cuervo AM. 2008. **Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function.** *Nat Med.* 14(9):959-65.
- Zhao Y, Bruemmer D. 2010. **NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (8):1535-41.
- Zhou T, Cheng J, Yang P, Wang Z, Liu C, Su X, Bluethmann H, Mountz JD. 1996. **Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells.** *J Exp Med.* 183(4):1879-92.

XIV. ANEXO I

SOLUCIONES

Western Blot

- Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (150ml) (Gel separador)
 - Tris base 1.5M (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 0.5M pH 6.8 (100ml) (Gel concentrador)
 - Tris base 0.5 M (6 g)
 - 60 ml agua bidestilada
 - Llevar a pH 6.8 con HCl 6N
 - Aforar a 100 ml. Almacenar a 4°C

- Buffer de corrida 10X pH 8.3 (1L)
 - 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 10X (1L)
 - Glicina 39mM (144g)
 - Tris base 48mM (30.3g)
 - MeOH 20%

- TBS 10X (1L)
 - Tris-HCl 200 mM, pH 7.5 (24.22 g)
 - NaCl 1.5 M (87.66 g)
 - Aforar a 1 L con agua bidestilada y almacenar a 4°C

- TBST 1X (1L)
 - 100 mL TBS 10x
 - Tween-20 0.1% (1mL)
 Aforar a un litro con agua destilada

- Bufer de carga 5X (10mL)
 - 3.55 mL H₂O
 - 1.25 mL Tris HCl 0.5M pH 6.8
 - 2.5 mL glicerol
 - 2 mL SDS 10%
 - 200 µl de azul bromofenol 0.5%
 Hacer alícuotas de 95 µl y almacenar a 4°C, antes de usar agregar 5 µl de β-mercaptoetanol

- Rojo de Ponceau (40mL)
 - Rojo de Ponceau 0.1% (40mg)
 - Ácido acético 5% (2mL)
 Se almacena a temperatura ambiente en oscuridad

- Leche 5% (10ml)
 - 500mg de leche en polvo sin grasa
 - Diluir en 10 ml de TBST
 Se prepara al momento

- RIPA
 - Tris HCl 50mM pH 8.5
 - NaCl 100mM
 - EDTA 1mM
 - NP-40/IGEPAL 0.1%
 - Deoxicolato de Sodio 0.25%
 - Inhibidores de proteasas 1X (opcional)
 - Inhibidores de fosfatasas 1X (opcional)
 Prepara al momento, mantener a 4°C

CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO CELULAR

- *D-MEM Dulbecco's Modified Eagle Medium* (1L)
 - Un sobre de D-MEM en polvo (Invitrogen 12100-046)
 - NaHCO_3 44mM (3.7g)

Disolver el medio en 800ml de agua milliQ, añadir el bicarbonato de sodio y ajustar el pH a 6.9 con HCl 6N. En campana aforar a 1lt y esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 μm . Almacenar a 4°C por no más de dos meses. Se puede alicuotar y congelar a -20C
- Suero Fetal Bovino SFB (10mL)
 - Calentar el suero fetal bovino (GIBCO #16000-044) a 56°C por 30 minutos, para inactivar las proteínas del complemento.
 - Dentro de la campana de flujo, hacer alícuotas de 40 mL y almacenar a – 20°C
 - Al usarlo descongelar la alícuota y mantenerlo a 4°C hasta un mes.
- Buffer Salino de Fosfatos PBS (1L)
 - NaCl 136 mM (8g)
 - KCl 2 mM (0.2g)
 - Na_2HPO_4 10 mM (1.44g)
 - KH_2PO_4 1mM (0.24g)

Disolver en 900ml de agua grado cultivo y aforar a 1L
Dentro de la campana de flujo, esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 μm . Almacenar a 4°C o temperatura ambiente.
- Tripsina 0.25 % (10ml)
 - 1 mL de tripsina 2.5% (GIBCO #15090-046)
 - 9 mL de Verseno (GIBCO #15040-066)

Diluir la tripsina en el verseno dentro de la campana de flujo y almacenar a 4°C hasta un mes.
- *GPS 100X (Glutamine/Penicilline/Streptomycine)*
 - 100ml de Glutamax 200mM (Invitrogen 35050-061)
 - 300mg de penicilina
 - 500mg estreptomycina

Agregar la penicilina y la estreptomycina a 10ml de Glutamax en la campana. Esterilizar con un filtro de 0.22 μm . Agregar la mezcla a los 90ml restantes de Glutamax, mezclar y hacer alícuotas de 5ml y almacenar a -20C. Al usarlo, descongelar y mantenerlo a 4C hasta 1 mes.

- DMEM suplementado (250mL)
 - 220 ml de DMEM
 - 25 ml de FBS (final 10%)
 - 2.5 ml de GPS 100X / glutamina
 - 2.5ml de piruvato de sodio (final 1mM; Invitrogen 11360-070)En la campana de flujo, mezclar y almacenar a 4C hasta 1 mes.
- Azul de tripano 10% (10mL)
 - 1 mL de azul de tripanoDentro de la campana de flujo aforar a 10 mL con PBS. Filtrar a través de una membrana de 0.22 μm . Almacenar a temperatura ambiente.
- Sustancia P (SP, Sigma Aldrich #S6883)
 - Disolver el contenido en el volumen necesario de agua grado cultivo, para una concentración de 100 μM
 - Hacer alícuotas de 100 μl 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.