



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**El papel de la SUMOilación en la muerte celular
autofágica mediada por el receptor nuclear NR4A1**

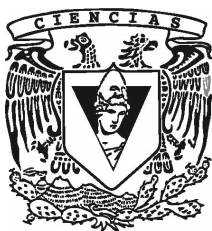
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ANA PAULINA DE LAS PEÑAS RINCÓN



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

I. Tabla de contenido

I. Tabla de contenido	1
II. AGRADECIMIENTOS	6
A la Dra. Susana Castro Obregón por haber sido mi tutora y guía a lo largo de este proyecto, por su interés en mi formación como estudiante pero sobre todo por haber hecho de este, mi primer encuentro con la ciencia, uno tan completo y enriquecido.	6
Al Dr. Luis Covarrubias por su apoyo durante mi estancia en su laboratorio.	6
Al Dr. Chris Wood y el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por su apoyo técnico.	6
A M. en C. Concepción Valencia por su apoyo técnico.	6
A mi comité sinodal por sus comentarios y correcciones.	6
A mí familia, a mi Padre, Madre y hermano, por su apoyo incondicional.	6
A mis amigos dentro y fuera del laboratorio por haber hecho de cada Western Blot, uno más divertido. Sus sabios consejos, las discusiones entrañadas y sobre todo las risas, quedan grabadas como motores imprescindibles en el día a día de este proyecto.	6
III. ABREVIATURAS	6
IV. RESUMEN	9
V. INTRODUCCIÓN	10
Autofagia	10
La autofagia detrás del telón: su mecanismo molecular	12
Inducción	12
Nucleación	14
Expansión y Cierre: Dos sistemas de conjugación fundamentales	14
Sistema de conjugación ATG12- ATG5	14
Sistema de conjugación LC3-PE	16
Muerte Celular Programada	17
Un poco de historia... ..	17
Tipos de Muerte celular programada.....	17
Generalidades de la función de la muerte celular y en particular de la muerte por autofagia	20
VI. ANTECEDENTES.....	23
El modelo de muerte autofágica inducida por SP/NK ₁ R y el receptor nuclear NR4A1	23
El Receptor nuclear NR4A1.....	24
Regulación de NR4A1	26
NR4A1 es necesario para la muerte inducida por SP/NK ₁ R.....	27

SUMO	28
Proteína Viral Gam1 y su papel respecto al receptor NR4A1.....	29
La muerte celular inducida por SP/NK ₁ R es inhibida por Gam1	31
VII. JUSTIFICACIÓN	33
VIII. HIPÓTESIS	34
IX. OBJETIVOS	34
Objetivos Generales	34
Objetivos Particulares	34
X. METODOLOGÍA	35
Biología Molecular	35
Preparación de Bacterias Competentes	35
Transformación de Bacterias Competentes	35
Purificación de Plásmido	36
Biología Celular	36
Mantenimiento Celular	36
Congelación de líneas celulares	37
Descongelación de líneas celulares.....	37
Transfección de DNA	37
Transfección transitoria por CaCl ₂	37
Transfección transitoria por PEI (polietilenimina)	38
Transfección de DNA/RNAi.....	39
Transfección transitoria por Lipofección.....	39
Modelo de muerte inducida por SP/NK ₁ R.....	41
Inducción e inhibición del flujo de la autofagia celular.....	41
Determinación de viabilidad celular	42
Por exclusión de azul de tripano.....	42
Por actividad extracelular de la enzima LDH	42
Bioquímica.....	43
Obtención de extractos de proteínas.....	43
Cuantificación de Proteína	44
Western Blot.....	46
Electroforesis en gel desnaturizante de acrilamida con dodecil sulfato (SDS-PAGE).....	46

Transferencia de proteínas de gel de poliacrilamida a membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride):	47
Bloqueo de membrana PVDF e incubación con anticuerpos	49
Revelado por quimioluminiscencia:	50
Revelado por fluorescencia:	50
Inmunofluorescencia.....	51
XI. Resultados	54
La presencia de Gam1 no interfiere con el procesamiento de los complejos tipo ubiquitina de la maquinaria central autofágica.....	54
Estandarización de la transfección de plásmidos utilizando polietilenimina	54
La presencia de Gam1 no interfiere con la formación del conjugado ATGtg5-ATG12	57
La presencia de Gam1 no interfiere con el procesamiento de LC3-I en LC3-II	58
Gam1 no interfiere con la formación de autofagosomas.....	59
Gam1 no interfiere con el flujo de la autofagia	63
Las secuencias aminoacídicas de las proteínas LC3, ATG12 y ATG5 carecen de sitios consenso para la SUMOilación.....	64
La SUMOilación del receptor NR4A1 es necesaria para que ejecute su función durante la muerte autofágica inducida por SP/NK ₁ R.....	66
Los interferentes pequeños de RNA (siRNA) contra la región 3' no traducida de NR4A1 funcionan para silenciar específicamente la expresión endógena de NR4A1.....	66
La mutante triple en sitios de SUMOilación de NR4A1 es incapaz de matar durante la muerte autofágica inducida por SP/NK ₁ R.....	69
XII. Discusión.....	72
XIII. Conclusiones.....	77
XIV. Perspectivas.....	77
XV. Anexo: Preparación de Soluciones	79
Biología Molecular	79
Crecimiento Bacteriano.....	79
Medio LB.....	79
Medio LB sólido.....	79
Medio Selectivo	79
Buffer TAE10X.....	80
Buffer TBE 5X	80

Medio SOC (super optimal broth with catabolite repression).....	81
Bioquímica.....	81
Western Blot.....	81
Tris-HCl pH8.....	81
NaCl.....	81
EDTA pH 8.....	81
Igepal.....	82
Deoxicolato 10%.....	82
Buffer de lisis.....	82
Solución de Bradford.....	82
Buffer del Gel Separador: Tris-HCl 1.5M pH 8.8.....	82
Buffer del gel Concentrador.....	83
Persulfato de amonio 10% (APS).....	83
Buffer de carga para proteínas 5X.....	83
Buffer de Corrida 10X pH8.3.....	84
Buffer de transferencia.....	84
Rojo de Ponceau.....	84
TBS 10X.....	84
TBST.....	85
TBST/BSA 5%.....	85
Leche 5%.....	85
Solución desnudante para remover anticuerpos.....	85
Biología Celular.....	86
Crecimiento y mantenimiento celular.....	86
D-MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium).....	86
Suero Fetal Bovino (FBS: Fetal Bovine Serum).....	86
GPS 100X (Glutamina/Penicilina/Estreptomicina).....	86
Tripsina 0.25%.....	87
Buffer salino de fosfatos (PBS) 10X.....	87
Medio DMEM suplementado.....	87
<i>Medio de congelación 2X</i>	88
Inmunocitoquímica.....	88

Praformaldehido 4%.....	88
Tritón/PBS 2%	88
BSA/PBS 4%	88
BSA 2%.....	88
Suero de cabra 4% en BSA/PBS 4%	89
Transfección por CaCl ₂	89
HBS 2X:	89
CaCl ₂ 2M	89
Transfección por PEI (polietilenimina)	90
Preparación de Stock PEI 10X	90
Preparar PEI 1X	90
Viabilidad Celular	90
Azul de tripano 0.04%	90
Buffer de Fosfato de Potasio pH7,5	90
Buffer piruvato.....	91
Buffer de lisis 10X.....	91
Muerte celular inducida por SP	91
Sustancia P	91
XVI. Bibliografía	92

II.AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Castro Obregón por haber sido mi tutora y guía a lo largo de este proyecto. Por su interés en mi formación como estudiante pero sobre todo por haber hecho de este, mi primer encuentro con la ciencia, uno tan completo y enriquecedor.

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

A la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente por sus consejos, apoyo y enriquecidas discusiones a lo largo del proyecto.

Al Dr. Chris Wood y al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por sus sugerencias y apoyo técnico.

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

A mi Comité Sinodal: Dra. Ma. Sandra Cabrera Benítez y Dra. Ma. Luisa Escobar Sánchez por sus comentarios y correcciones.

A mi familia: Eduardo De las Peñas Nava, Alma Patricia Rincón Baltazar y mi hermano Eduardo De las Peñas Rincón, por su apoyo incondicional.

A mis amigos dentro y fuera del laboratorio, en Cuernavaca y en el D.F., por haber hecho de cada Western Blot, uno más ameno. Sus sabios consejos, las discusiones entrañadas, y sobre todo las risas, quedan grabadas como motores imprescindibles en el día a día de este proyecto.

III.ABREVIATURAS

Atg: Proteínas relacionadas con la autofagia.

ATP: Adenosín trifosfato (adenosin triphosphate).

CQ: Cloroquina, agente lisosomatrópico que evita la acidificación del lisosoma y su fusión con autofagosomas.

CELO: adenovirus letal de embriones de pollo(chicken embryonic lethal orphan).

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

DNA: ácido desoxirribonucleico (desoxirribonucleic acid).

GAM1: proteína del virus CELO inhibidora de la SUMOilación.

GFP-LC3: Construcción de la proteína LC3 unida a la proteína reportera verde fluorescente (Green fluorescent protein).

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

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

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

LC3-I: LC3 activado

LC3-II: LC3 conjugado a PE.

MCP: muerte celular programada.

mTOR: blanco de la rapamicina en mamíferos (target of rapamicine in mammals).

mutNR4A1: mutante triple en sitios de SUMOilación del receptor NR4A1 (NR4A1-K102R, K558R, K577R)

NK₁R: Receptor de neurokinina-1 (neurokinin 1 receptor)

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

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

pcDNA: vector de expresión constitutiva en mamíferos.

pcDNA_NR4A1: receptor clonado en el vector pCDNA.

PE: fosfatidil etanolamina (phosphatidiletanolamine).

PIAS: familia de proteínas inhibidoras de proteínas STAT (protein inhibitor of activated STATs) fungen como enzimas E3 o ligasas de SUMO.

ΨKXE: Secuencia consenso de SUMOilación.

Rapa: Rapamicina, antibiótico inhibidor de mTOR.

RNA: ácido ribonucleico (ribonucleica cid).

SAE1-SAE2: heterodímero conformado por dos prteínas que actúan en conjunto como la enzima E1 de la SUMOilación.

SENP: proteasas específicas de sentrina en mamíferos (sentin-specific proteases).

siRNA: RNA pequeño de interferencia (small interfering RNA).

siRNA UTR3': siRNA cuyo blanco es la región no traducida del extremo 3' (untranslated region) del gen en cuestión.

SUMO: proteína modificadora similar a ubiquitina (small ubiquitin-like modifier).

TRE: Trehalosa, disacárido conformado por dos moléculas de glucosa, presente en bacterias, hongos, plantas e invertebrados.

Ubc9: Enzima E2 o conjugadora de SUMO.

IV.RESUMEN

La autofagia es un proceso celular exclusivo de células eucariontes que se encuentra conservado evolutivamente desde levaduras hasta mamíferos; su función es catabólica y dependiente del lisosoma. Existen diferentes tipos de autofagia, sin embargo, nuestro trabajo se enfoca principalmente en la macroautofagia. Esta última ha sido la más estudiada hasta el momento y es el único tipo de autofagia que requiere la formación de una vesícula llamada autofagosoma. En condiciones normales, funge como sistema de desechos mediante el cual mantiene un control de calidad sobre los componentes intracelulares. En condiciones de estrés nutricional, ésta compensa la falta de nutrientes proveiéndolos a la célula. Los blancos comunes de la autofagia son proteínas mal plegadas o que ya de vida media larga que ya han cumplido su función y organelos disfuncionales que, al ser degradados, se descomponen en macromoléculas con el fin de reintegrarlas al metabolismo celular. En condiciones de estrés prolongado, la autofagia puede contribuir a un tipo de muerte celular que se distingue de otras formas de muerte, como la apoptosis, al presentar una morfología característica del flujo intensivo de la autofagia. Este tipo de muerte se evita si se inhiben las proteínas de la maquinaria autofágica, no así las asociadas a la apoptosis.

En el laboratorio trabajamos con un modelo de muerte autofágica inicialmente caracterizado en neuronas cuya inducción depende del receptor membranal NK_1R también conocido como receptor a Taquiquinina 1 y la unión de su ligando, la Sustancia P (SP). Esta unión desencadena una cascada de señalización que conlleva la expresión y la modificación post- traduccional por SUMOilación del receptor nuclear huérfano NR4A1, así como a un aumento en el flujo autofágico. La SUMOilación consiste en la conjugación de la proteína SUMO a una proteína blanco, en este caso NR4A1; esta modificación puede determinar su localización intracelular, su función y/o fomentar su estabilidad. En resultados previos, se observó que en presencia de Gam1, una proteína inhibidora de la SUMOilación, la muerte celular autofágica deja de ocurrir. En este trabajo se estudió el mecanismo por el cual Gam1 evita la muerte autofágica; los resultados indican que la presencia de Gam1 impide la SUMOilación de NR4A1, siendo esta modificación necesaria para promover la muerte celular por autofagia.

V. INTRODUCCIÓN

Autofagia

La autofagia del griego 'auto', refiriéndose a propio y 'phagos', comer, como su origen etimológico lo indica, es un acto de autocanibalismo en el cual la célula se degrada a sí misma^{1,2}. Christian de Duve acuña el término autofagia en 1963 al observar organelos contenidos en lisosomas en diferentes estadios de degradación³. La autofagia, es un proceso celular exclusivo de células eucariontes conservado a lo largo de la filogenia desde levaduras hasta mamíferos. Es un proceso

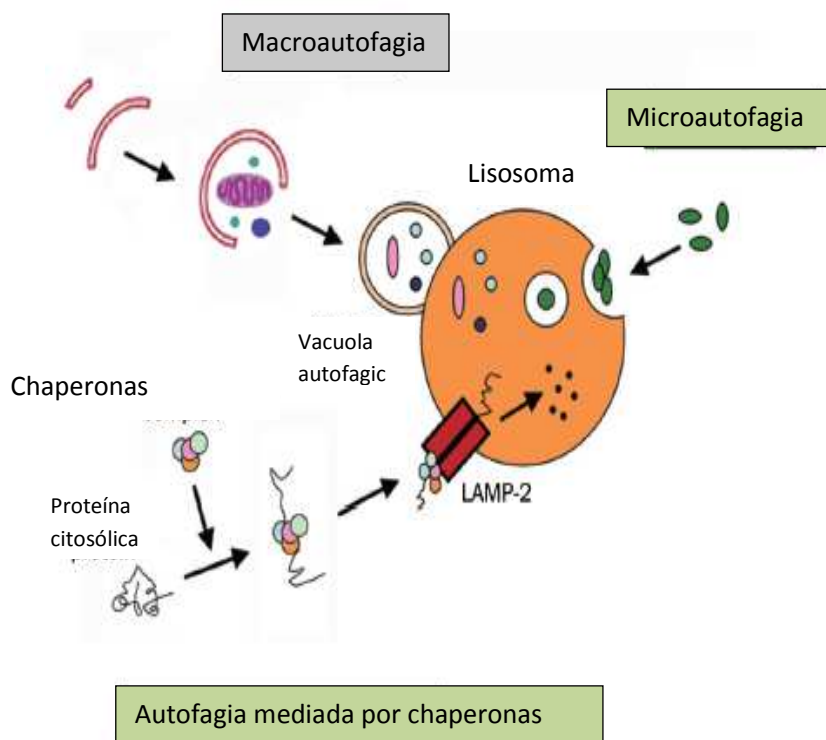


Ilustración 1. Esquema de los diferentes tipos de autofagia.⁶⁸

necesidades de la célula^{4, 5-7}. Además es un mecanismo que le permite a la célula digerir grandes cantidades de desechos celulares, lo cual le permite proveer a la célula de componentes reutilizables. Este conjunto de funciones hacen de la autofagia un proceso fundamental para la homeostasis y viabilidad celular. Gracias a estas funciones, la autofagia es un proceso importante para la célula cuando se trata de contender con la falta de nutrientes.

catabólico
dependiente de
lisosoma cuyos
blancos son proteínas,
porciones de
citoplasma y
organelos
disfuncionales. Al ser
degradados, se
descomponen en
unidades de
macromoléculas que
podrán ser
reintegradas al
metabolismo o bien
desechadas, de
acuerdo a las

Existen tres tipos de autofagia: microautofagia (1), autofagia mediada por chaperonas (2) y macroautofagia (3). Los tres difieren entre sí de acuerdo al mecanismo que utilizan para hacer llegar los componentes que serán degradados al lisosoma (Ilustración 1). La primera induce la invaginación de la membrana lisosomal, mientras que la segunda transloca las proteínas por degradar desde el citoplasma hacia el lumen lisosomal valiéndose de proteínas membranales y chaperonas que forman parte del lisosoma y finalmente la tercera, a la que llamaremos autofagia de aquí en adelante, es el único tipo de autofagia que requiere de la formación *de novo* de una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma (Ilustración 2)⁸. El autofagosoma rodea los componentes a degradar hasta sellarse por completo, aislándolos del resto del citoplasma. Una vez sellado, se fusiona a un lisosoma formando un compartimiento nuevo, llamado autolisosoma, que permite el contacto entre la carga del autofagosoma y las enzimas lisosomales que se encargarán de su degradación.

Existe una diversidad de estímulos estresantes que amenazan la homeostasis de una célula e incluso llegar a comprometer su supervivencia. La autofagia es un medio del cual se vale la célula para defenderse⁴. Dependiendo del origen, intensidad y duración de la amenaza, se genera la respuesta autofágica que le corresponderá. Existen dos formas de autofagia: la basal y la inducida.⁹ La autofagia basal representa los niveles mínimos constantes de autofagia necesarios para contender con estreses de menor impacto como la degradación y reciclaje de componentes citoplásmicos de rutina. Estos podrían

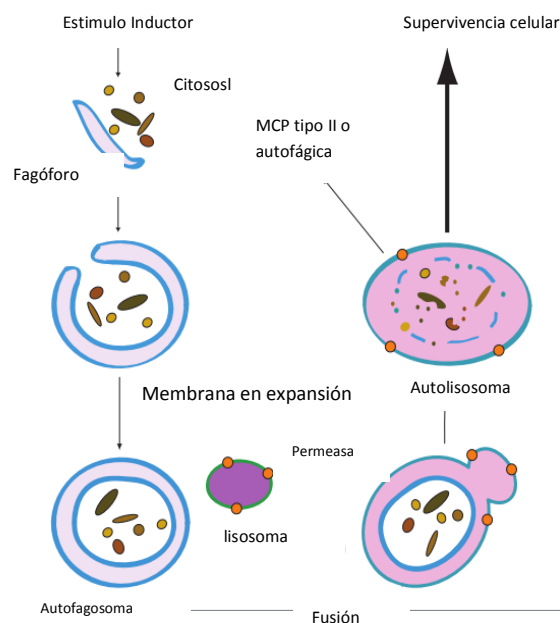


Ilustración 2. Formación del autofagosoma y del autolisosoma. Tras la inducción de la autofagia, se forma a partir de una membrana de aislamiento o fagóforo que se expandirá cerca de los componentes citoplásmicos a degradar, hasta cerrarse por completo, formando un autofagosoma. Al fusionarse con un lisosoma, las hidrolasas de este último procesarán las proteínas y organelos contenidos logrando su degradación. Modificado de ⁴.

ser proteínas que ya han cumplido con su función, mal plegadas u organelos disfuncionales como mitocondrias, retículo endoplásmico, etc.⁹. La autofagia inducida, por otro lado, responde a

estímulos estresantes de mayor impacto que pueden ser internos o externos a la célula. Entre ellos, la falta de nutrientes (aminoácidos, glucosa, ATP, lípidos), presencia de patógenos intracelulares (microorganismos), privación de factores de crecimiento (*i.e.* insulina, etc.), especies reactivas de oxígeno, etc.⁹⁻¹³. En condiciones de estrés prolongado donde el estímulo inductor sobrepasa la capacidad autofágica, esta puede no parar de fagocitar y corre riesgo de tornarse nociva para la célula actuando entonces como un tipo de muerte celular que se detalla más adelante¹⁴.

La autofagia detrás del telón: su mecanismo molecular

El proceso molecular de la autofagia puede dividirse en cuatro etapas: 1) inducción, 2) nucleación, 3) expansión y cierre y 4) formación de autolisosoma¹⁵. (Ilustración 3)

Inducción

Muchas de las vías que sensan el estado nutricional de la célula también inducen autofagia y muchas de ellas convergen en la proteína blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) (Ilustración 3). Esta es una proteína con actividad cinasa que entre algunas de sus funciones, se encuentran regulación de la síntesis de proteínas y sirve como inhibidor activo de la autofagia¹⁶.

En condiciones homeostáticas, mTOR se encuentra asociado constitutivamente al complejo ULK que consta de: ULK1, ATG13, FIP200 (family- interacting protein de 200KD) y ATG101. En el complejo mTOR fosforila a ULK1 e hiperfosforila a ATG13, evento que resulta en el bloqueo de la autofagia. En condiciones de inanición o estrés celular, mTOR es defosforilado, lo provocando su disociación del complejo ULK1 e impidiendo la fosforilación de ATG13 (Ilustración 3a). Por su parte, ULK1, al separarse de mTOR, se defosforila y se activa; al ser una cinasa, se autofosforila en sitios diferentes de donde era fosforilado por mTOR y fosforila a ATG13 y FIP200. De esta manera es como se promueve el reclutamiento de Beclina- 1 al retículo endoplásmico donde comienza la elongación de la membrana de aislamiento que es el nombre que se le da a los primeros fosfolípidos que son destinados a la membrana del autofagosoma (Ilustración 3b)^{17,4,18}.

Existen compuestos que pueden inducir autofagia de manera ectópica, como son la rapamicina y la trehalosa. La primera es un antibiótico que tiene como blanco a mTOR; al unirse a él, lo inactiva dando lugar a la cascada de defosforilaciones previamente descrita, induciendo autofagia¹⁹. La trehalosa, por otro lado, es un disacárido que se encuentra en organismos no mamíferos como bacterias, levaduras, invertebrados y plantas, en las cuales finge como protector contra cambios de temperatura, disecación, deshidratación u oxidación²⁰. En mamíferos, se ha observado que la presencia de trehalosa induce autofagia utilizando una vía independiente a la de mTOR²⁰. Al agregar trehalosa a células neuronales tratadas con epoximicina, un fármaco neurotóxico que induce el fenotipo neurodegenerativo asociado a la enfermedad de Huntington que eventualmente lleva a la muerte, se observa un incremento en autofagosomas y con ello, la disminución de agregados de Huntingtina y α -sinucleina; lo cual, en conjunto, promueve la supervivencia celular²¹.

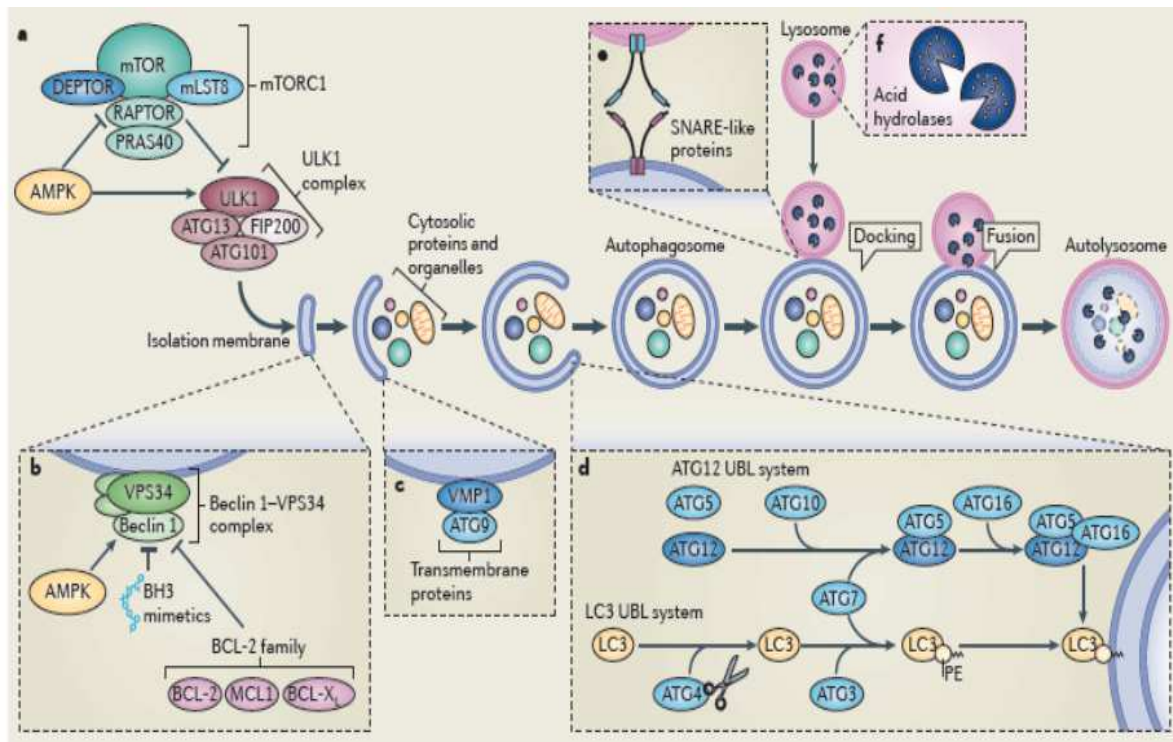


Ilustración 3. Esquema detallado de las diferentes etapas de maduración de un autofagosomas en mamíferos. En a) observamos la inducción que involucra la inactivación del complejo mTOR vía AMPK, lo cual elimina la inactivación del complejo ULK1 que puede suceder vía mTOR; vía AMPK también se activa el complejo ULK y se trasloca a la membrana de aislamiento. En b) observamos el reclutamiento del complejo Beclina-1-Vps34 que podría ser inducido por AMPK o bien inhibido por elementos de la familia BCL-2. En c) observamos el reclutamiento de la proteína transmembranal Atg9 al fagóforo que ha comenzado a rodear elementos específicos de citoplasma. En d) observamos los sistemas de conjugación tipo ubiquitina ATG5-ATG12 y LC3-fosfatidil etanolamina (PE) que promueven el rápido elongamiento de la membrana del autofagosoma. En e) observamos el anclaje de un lisosoma a la membrana autofagosomal utilizando proteínas SNARE como mediadoras preparándose para la fusión y formación del autolisosoma. En f) observamos un acercamiento al contenido lisosomal que consta de hidrolasas ácidas que se encargaran de degradar el material al interior del autolisosoma.⁶⁹

Nucleación

Esta es la fase donde se reclutan proteínas relacionadas a la autofagia (ATG) a la región de ensamblaje del fagóforo, también conocido como PAS, en levadura (por sus siglas en inglés “*phagosome assembly site*”) (ver Ilustración 3). La nucleación involucra la activación de la fosfatidil inositol kinasa clase 3 (PI3K3) quien promueve la formación de fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P), encargado de reclutar a ATG9, una proteína transmembranal residente del aparato de Golgi o de membrana plasmática. Generalmente, ATG9, llega al PAS transportándose vía endosomas o a través del flujo vesicular trans- Golgi (Ilustración 3c). Esta proteína ayuda al crecimiento de la membrana del autofagosoma llevando lípidos desde diferentes organelos y promueve el reclutamiento de los sistemas de conjugación ATG12 y LC3 (Ilustración 3d) ^{17 4,18}.

Expansión y Cierre: Dos sistemas de conjugación fundamentales

Existen dos sistemas de conjugación, similares a la ubiquitinación, involucrados en la elongación y sellado del autofagosoma: ATG12-ATG5 y LC3-PE (fosfatidil etanolamina). ²² En el sistema ubiquitina –proteosoma, la ubiquitina, para ser conjugada, es sintetizada como precursor y es procesada por una proteasa que expone el carboxilo terminal de uno de sus residuos de glicina lo que permite su activación por la enzima E1; posteriormente, es transferida a la enzima E2, en ambos casos dando lugar a un enlace tioéster. Finalmente, la ligasa E3 transfiere la ubiquitina a la proteína blanco. La relación de nuestras proteínas de interés, LC3 y ATG12, con ubiquitina, es importante pues las tres presentan semejanzas tridimensionales, lo que hace de su conjugación un proceso bioquímico similar donde se forman el mismo tipo de enlaces (Ilustración 4A, B) ²³.

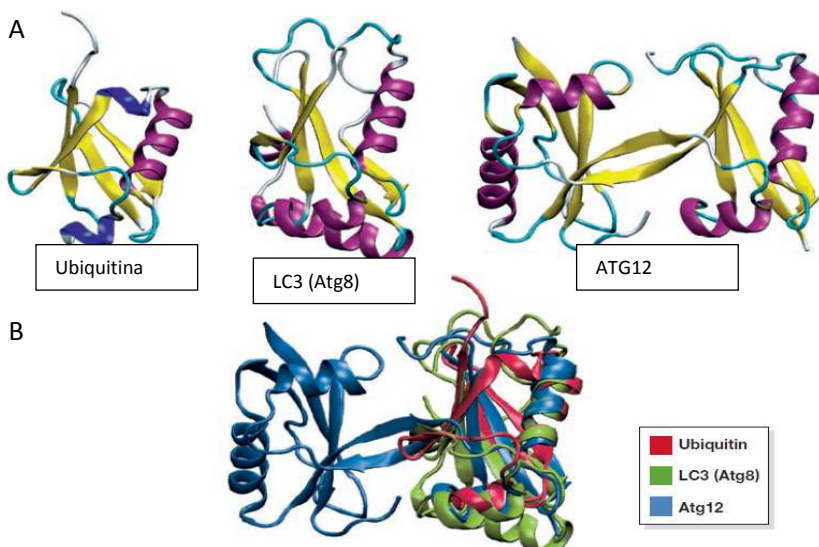


Ilustración 4. Semejanzas estructurales entre ubiquitina, LC3 y ATG12. En A se observan las estructuras tridimensionales de Ubiquitina, LC3 y ATG12 de manera individual. En B se observa el sobrelape de los tres modelos; en rojo observamos UBQ, en verde LC3 y en azul ATG12. Tomado de ²³.

Sistema de conjugación ATG12- ATG5

Como parte de la inducción de autofagia, ATG12 se procesa en tres pasos catalizados por enzimas similares a las involucradas en ubiquitinación (E1, E2 y E3). A diferencia de la ubiquitina, no requiere de una proteasa para ser activado ya que está listo para unirse a la E1. La enzima E1 (ATG7), activa a ATG12 en una reacción dependiente de ATP formando un enlace tioéster entre una cisteína de ATG7 y el carbono terminal de la glicina de ATG12 (Ilustración3). Posteriormente, ATG12 es transferido a la enzima E2 (ATG10) con quien forma un enlace tioéster entre una cisteína de ATG10 y el residuo de glicina de ATG12. Finalmente, ATG12 se une a ATG5 mediante un enlace isopeptídico entre la glicina de ATG12 y una lisina de ATG5; la enzima E3 que cataliza este paso es al momento desconocida^{22,23}. Una vez conjugadas estas dos proteínas, se unen a ATG16L quien tiene la capacidad de homo-oligomerizarse formando complejos multiméricos de ATG12-ATG5-ATG16L que ahora son capaces de translocar al autofagosoma. Este complejo se une exclusivamente a la membrana externa del autofagosoma y se desprende momentos previos a la unión con el lisosoma²³. Interesantemente, este conjugado funge como E3 del sistema de conjugación LC3-PE que revisaremos a continuación, favoreciendo su reclutamiento a la membrana autofagosomal. El sistema ATG12-ATG5 es imprescindible para la autofagia, ratones deletéreos para *Atg5*^{-/-}, que aún tienen la contribución de la proteína materna, llevan un desarrollo embriológico normal, pero al poco tiempo de nacidos mueren; esto es un indicador de la importancia de este conjugado para la autofagia en etapas post-natales²⁴. Sin embargo, si se fecunda un óvulo *Atg5*⁻ con un espermatozoide *Atg5*⁻, no se desarrolla más allá del estado de 8 células²⁵ (Mizushima 2008, Autophagy 1076). En el organismo adulto, en neuronas, por ejemplo, donde la autofagia es la encargada de deshacerse de agregados protéicos ubiquitinados, la pérdida de ATG5 o ATG7, mantiene los agregados en citoplasma e induce neurodegeneración.^{22,26}

Sistema de conjugación LC3-PE

LC3, es una proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos, que adopta este nombre en mamíferos; fue descubierta a partir de su homología con Atg8 en levaduras. Previo al proceso de conjugación, al igual que ubiquitina, LC3 es tratado por una cistein proteasa, ATG4, que expone el carboxilo terminal de uno de sus residuos de glicina para generar la forma LC3-I. La enzima E1 (ATG7) activa a LC3-I utilizando ATP para formar un enlace tioester entre una de sus cisteínas y la glicina expuesta de LC3-I. Una vez activada, LC3-I se transfiere a ATG3, la E2 con quien forma también un enlace tioester. Finalmente, LC3-I se conjuga al lípido fosfatidiletanolamina (PE) mediante la unión del carboxilo terminal de su glicina; a este conjugado se le denomina LC3-II. El complejo ATG12-ATG5, como se mencionó anteriormente, es quien funge como enzima E3, promoviendo la unión de LC3-II a la membrana del autofagosoma (Ilustración 5).

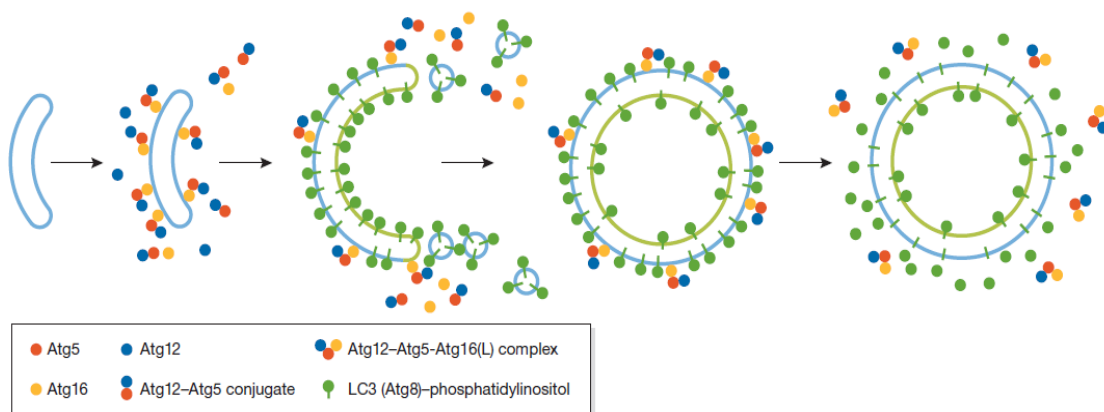


Ilustración 5. Esquema de la elongación del fagóforo hasta completar un autofagosoma. El conjugado que se ancla primero es el de Atg12-Atg5-Atg-16, quien se pega en la cara externa de la membrana y se desprende una vez completado el autofagosoma. El conjugado que se pega posteriormente es el de LC3-PE, en verde, quien se pega en ambas caras de la membrana autofagosomal y se mantiene hasta que el autofagosoma es maduro.²³

A diferencia del conjugado de Atg12, LC3-II se ancla tanto en la cara interna como en la externa del autofagosoma en crecimiento. LC3-II juega un papel importante en la maduración del autofagosoma, ya que fomenta su crecimiento y promueve su fusión con el lisosoma para formar el autolisosoma. La porción de LC3-II que quedó anclado en la cara interna del autofagosoma es degradado por las enzimas lisosomales, junto con el contenido del autolisosoma. En la cara exterior del autofagolisosoma, LC3B-II es rasurada por la proteasa ATG4, para convertirla en LC3-I, y de esta forma, entra en un nuevo ciclo de autofagia, es decir, se recicla.

La síntesis y el procesamiento de LC3 aumentan con la inducción de autofagia; estas características hacen de esta proteína, un fiel marcador de autofagosomas y reportero de la actividad autofágica^{22,24}. En ratones deficientes para *LC3B*, se observa que, pese a que este tiene una participación en el desarrollo y sistema nervioso, los ratones muestran un desarrollo normal embriológico, post-natal e incluso llegan a la edad adulta^{27,28}, lo que sugiere la existencia de otras proteínas análogas como mecanismo compensatorio; se conocen al menos cuatro ortólogos de LC3 en mamíferos (*GATE*, *GABARAPL1*, *GABARAPL2*, *ATG8-L*, *LC3A*). En células tumorales donde se reduce la expresión de *LC3* se ha observado una disminución en la susceptibilidad a ceramida¹⁸, un inductor de muerte por autofagia.

Muerte Celular Programada

Un poco de historia...

Fue en la segunda mitad del siglo XX cuando se propuso que la muerte de una célula perteneciente a organismos multicelulares, era un evento planeado más no azaroso como se pensaba. El parteaguas que condujo a esta idea fue el haber descubierto que las células se encuentran intrínsecamente programadas (*i.e.* genéticamente) para autodestruirse; y que, paradójicamente, la vida de una célula es un evento 'permisivo'. Es decir, está condicionado a la constante supresión de los programas de autodestrucción a lo largo del tiempo (Fuchs and Steller 2011). Las células aledañas son quienes mandan señales retroalimentando positivamente dicha supresión. Entonces, la permanencia de cada célula en un sistema organizado es consecuencia de la interacción social esperada para una célula sana, dando razón de existencia y perpetuidad. Estos sistemas de control de calidad funcionan tanto a nivel organismo como a nivel celular. La célula por sí misma se considera un sistema autónomo pues todos sus componentes (organelos, proteínas, etc.) actúan en armonía para mantener su funcionalidad. En caso de que alguno de estos falle, ésta puede, de manera intrínseca, activar sus programas de muerte y suicidarse. Ambas formas de inducir la muerte, ya sea intrínseca o extrínseca, tienen como finalidad la eliminación de células que pudieran comprometer la homeostasis del organismo completo³⁰.

Tipos de Muerte celular programada

La muerte celular programada (MCP) se describió originalmente en el estudio del desarrollo embrionario donde, de acuerdo al plan genético de cada organismo, se contempla la pérdida de conjuntos de células con el fin de moldear estructuras formadoras de tejidos y órganos. Sin

embargo, estas mismas formas de muerte celular ocurren no sólo en el embrión sino también en el organismo adulto. La más estudiada hasta el momento, es la muerte celular apoptótica²⁹. Sin embargo, no es la única forma de muerte; se ha observado que al inhibir las vías apoptóticas, la muerte sigue ocurriendo como en el caso de la sindactilia parcial que se observa en los ratones nulos para proteínas proapoptóticas como *Bax*^{-/-}; *Bak*^{-/-}; además estos ratones pueden alcanzar la edad adulta, otro indicador más de la existencia de otras formas de muerte que ocurren en ausencia de la vía apoptótica^{31,32}.

A partir de entonces, se han descrito tres tipos de MCP de acuerdo a sus características bioquímicas y morfológicas³³. En la Fig. 1 se pueden observar micrografías electrónicas con las características morfológicas de uno de estos tipos de muerte. El primero de ellas es **la apoptosis o muerte tipo I** (Fig.1A), en la que se presentan núcleos picnóticos (condensación del material nuclear), condensación del citoplasma y pérdida de las conexiones adherentes con células colindantes. La membrana se retrae diferencialmente formando pseudópodos, entran en contacto entre sí y se escinden del resto de la membrana, lo que da una apariencia de una membrana burbujeante. Organelos, citoplasma y fragmentos nucleares son empaquetados dentro de membranas formando cuerpos apoptóticos. Las células apoptóticas son engullidas y desintegradas por lisosomas de células aledañas. Bioquímicamente, esta muerte se caracteriza por la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular que sirve como señal de muerte. El

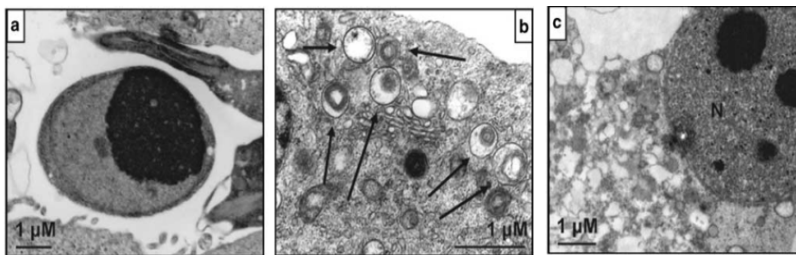


Figura 1. Tipos de Muerte celular. Micrografías electrónicas mostrando la ultra estructura celular de acuerdo a los tipos de muerte caracterizados. En a) observamos una célula de cáncer de pulmón humano (H1975) sufriendo apoptosis inducida por un inhibidor de factor de crecimiento epidermal. Notese la picnosis pronunciada y encogimiento celular. En b) observamos una célula de cáncer epitelial humano (HELA) sufriendo muerte celular autofágica en respuesta a un tratamiento tóxico contra retículo endoplásmico llamado tapsigargina. Se observan las células con una alta vesicularización encerrando citoplasma y organelos dentro de autofagosomas. En c) observamos cáncer de colon humano (HCT116) respondiendo a un estímulo necrótico. Mientras que el núcleo se encuentra prácticamente intacto, la membrana plasmática y el citoplasma están

proceso de desensamblado celular es ejecutado por proteasas llamadas caspasas.

Existen dos vías apoptóticas conocidas, la intrínseca o mediada por la mitocondria y la extrínseca o mediada por receptores de muerte localizados en la membrana extracelular. Las caspasas llevan a cabo cascadas

proteolíticas, mediante las cuales una sola caspasa activa varias procaspasas, amplificando la señal

de muerte y asegurando su irreversibilidad. Las caspasas se dividen en iniciadoras (-2, -8, -9 y 10) y efectoras (-3, -6 y -7). La vía extrínseca incluye la activación de receptores de la familia TNF (factor de necrosis tumoral) y la subsecuente participación de la caspasa -8 o -10 lo que resulta en la posterior activación de las caspasas ejecutoras. La vía intrínseca, esta dada por una serie de estímulos internos a la célula, que no están relacionados a receptores de muerte, entre los que pueden estar la ausencia de hormonas de crecimiento, la presencia de radicales libres, hipoxia, entre otros. Bajo estas condiciones se induce la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo- c del espacio intermembranal hacia el citoplasma. La unión del Citocromo- c junto con APAF-1 y procaspasa 9, conforman el complejo denominado apoptosoma. Quiénes controlan esta serie de eventos son proteínas parte de la familia Bcl-2, por un lado las antiapoptóticas como BCL-2, BCL-X_L, etc. por otro, las proapoptóticas Bax y Bak, entre otras. Eventualmente, tanto la vía intrínseca como la extrínseca terminarán activando a las caspasas ejecutoras siendo el papel más relevante el de la caspasa -3 que es activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras y que, en conjunto con caspasa -6 y -7 activan endonucleasas que se encargan de la fragmentación del DNA y proteasas que degradan el núcleo y el citoesqueleto. La externalización asimétrica de fosfatidilserina en la membrana celular es un indicativo de reconocimiento por células fagocíticas para que ejerzan su función y degraden la célula en cuestión.³⁴

El segundo tipo de muerte es por autofagia o tipo II (Fig. 1B). Presenta vesicularización masiva del citoplasma celular, siendo estas vesículas autofagosomas u autolisosomas. El aparato de Golgi se encuentra distendido para la formación de lisosomas. La membrana plasmática se mantiene prácticamente intacta presentando un flujo endocítico que ayuda a disminuir la extensión de la membrana plasmática. El núcleo no suele presentar picnosis. Los restos celulares finalmente también son digeridos por células colindantes. Bioquímicamente, este tipo de muerte se distingue por depender de la maquinaria autofágica previamente descrita.

La muerte citoplásmica o tipo III (Fig. 1C) se caracteriza por una desintegración celular en fragmentos sin involucrar lisosomas, sin embargo este tipo de muerte no ocurre en el desarrollo embrionario y se considera más bien una pérdida patológica de células.³⁵³³ Un tipo de muerte tipo III es la **necrosis** que se caracteriza por presentar oncosis (ganancia de volumen en organelos y citoplasma). Se observa desintegración de estructuras internas, organelos y citoplasma; culmina con la ruptura de la membrana plasmática y exposición del contenido celular al intersticio. El

núcleo presenta fragmentación del material cromosómico y ruptura de la membrana nuclear. Los lisosomas no parecen estar involucradas en este tipo de muerte. Los fragmentos resultantes no son empaquetados en membranas ni fagocitados por células vecinas, lo que resulta en un proceso inflamatorio. La muerte celular necrótica ha sido controversial pues por mucho tiempo se creyó que era una muerte accidental, sin embargo ya hay evidencia de que ciertas proteínas correlacionan con su aparición, estableciendo que puede haber un programa determinado que la orquesta en el organismo adulto, aunque no forma parte del desarrollo embrionario, pues dañaría los tejidos. La actividad de ciertas proteínas correlaciona con este fenómeno como RIP (proteína interactuadora con receptor), PARP1 (polimerasa-1), catepsinas, etc. ^{33,36,37}.

Generalidades de la función de la muerte celular y en particular de la muerte por autofagia

La muerte celular fisiológica es imprescindible. En el embrión actúa moldeando estructuras (ilustración 6 A,B) tales como pérdida de interdígitos o en la metamorfosis de *Drosophila melanogaster* o en la regresión de los ductos Müllerianos en mamíferos. Además actúa para controlar el número de células (ilustración 6C) y la eliminación de células alteradas (Ilustración D).

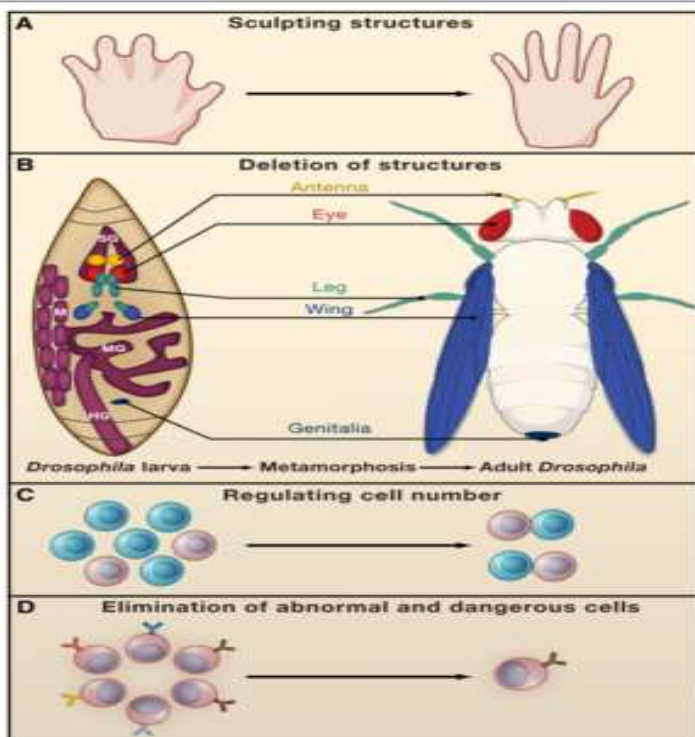


Ilustración 6. Funciones de la muerte celular en el organismo. En a) observamos la remodelación de estructuras en el desarrollo embrionario, por ejemplo en la pérdida de interdígitos. En b) se ejemplifica la desaparición de estructuras en procesos metamórficos, como es el caso en las glándulas salivales presentes en la larva y ausentes en la mosca adulta. En c) se observa la regulación del número de células y en d) la eliminación de células aberrantes. ²⁷

La existencia de la muerte celular programada por autofagia se ha demostrado en el desarrollo de las moscas. Cuando estas sufren metamorfosis de la larva a la mosca adulta, las glándulas salivales se eliminan por MCP. Se ha observado que la inactivación de genes ejecutores la autofagia, las glándulas salivales ya no se eliminan, por lo que este tipo de MCP es mediado por autofagia^{29,32}. Un ejemplo reciente de muerte celular autofágica en el organismo adulto, ocurre durante la infección del virus H5N1, que es mortal. Se observó que en células pulmonares de pacientes infectados y de ratones infectados, se observó una acumulación de autofagosomas a diferencia de ratones infectados con el virus H1N1, que no es mortal. Resulta que la variante viral H5N5 es mortal porque induce muerte celular autofágica de las células pulmonares. Esto lo demostraron al observar que inhibiendo la autofagia (evitando la expresión de un gen de la maquinaria central de la autofagia por RNAs interferentes) se evita la muerte de células pulmonares. En la (Fig. 2A) se observan micrografías electrónicas de las células de ratones infectados con las dos cepas virales, en donde se nota que el virus mortal induce la formación de vesículas tipo autofagosomas en contraste con las micrografías de células infectadas con el virus no mortal. En la Fig.2B observamos la cuantificación correspondiente de los autofagosomas. En la Fig.2C observamos que al silenciar la proteína autofágica ATG5 con siRNA, es suficiente para restaurar la viabilidad en células infectadas con el virus H5N1. Con estos dos ejemplos podemos decir que la muerte celular autofágica juega un papel importante tanto en el desarrollo embrionario como en el adulto, por lo que entender cómo se regula a nivel molecular, además de ayudarnos a entender el desarrollo embrionario, tiene un potencial impacto en la medicina.

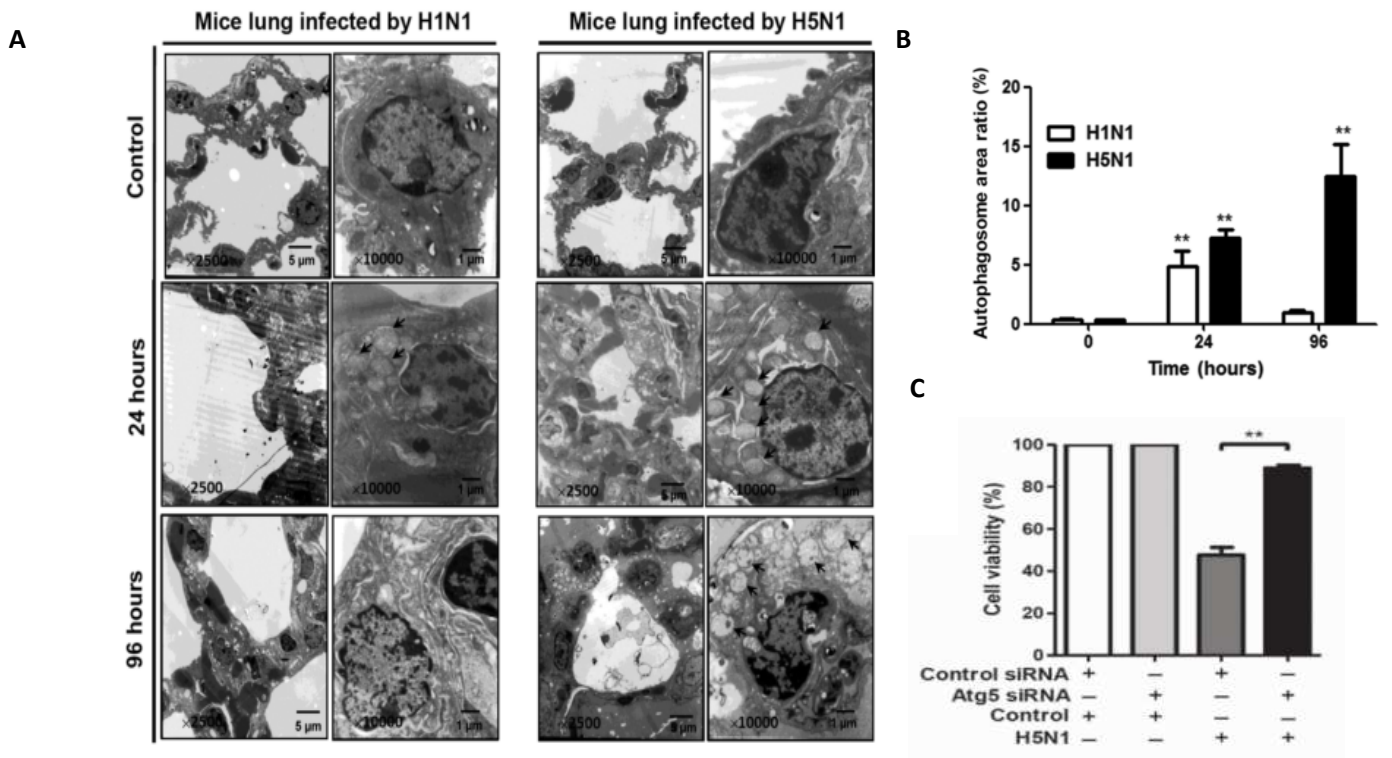


Figura 2 Muerte celular autofágica en células de pulmón de ratón infectadas ya sea con el virus H5N1 o bien con H1N1. En a) se observan micrografías electrónicas de células infectadas con el virus indicado a tres tiempos diferentes. Son imágenes representativas de tres experimentos independientes y en b) la cuantificación correspondiente al área ocupada por autofagosomas. En c) se observa la viabilidad celular representada en porcentajes en presencia/ausencia del siRNA contra Atg5.

VI. ANTECEDENTES

El modelo de muerte autofágica inducida por SP/NK₁R y el receptor nuclear NR4A1

La sustancia P (SP) es un neurotransmisor undecapéptido perteneciente a la familia de las taquininas que se ha visto involucrado en patologías donde ocurre muerte celular como isquemia y estatus epiléptico³⁸. Su receptor es la proteína transmembranal a Neuroquinina1 (NK₁R), que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y que se ha asociado a muerte celular, ya que su antagonista protege de lesiones y evita la muerte por ácido kaínico en el hipocampo³⁸. En cultivos primarios de neuronas del cuerpo estriado, del hipocampo y de la corteza cerebral, la presencia de SP induce un tipo de muerte diferente a la apoptótica, pues además de no mostrar morfología apoptótica, es independiente de caspasas, ya que la muerte celular no se evita en presencia de un inhibidor de caspasas llamado z-VAD³⁸. Además carece de translocación de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, mientras que el núcleo y la membrana celular se conservan intactas ; en cambio, se acompaña de la aparición de autofagosomas en el citoplasma (Fig.3). Se estableció que se trata de muerte celular tipo II o por autofagia, ya que la inhibición de la autofagia evitó la muerte celular³⁹. Este programa de muerte celular no es específico de neuronas, ya que al expresar ectópicamente al receptor NK₁R en células no neuronales, cuando se agrega la SP también mueren por un mecanismo dependiente de autofagia e independiente de apoptosis. Se caracterizó la cascada de señalización que resulta de la unión de SP/NK₁R. Consiste en el reclutamiento de un complejo protéico que inicia con arrestina2, quien activa y acopla a MAPKKK (Raf1), quien a su vez activa a MAPKK (MEK2), ésta a MAPK (ERK2), la cual fosforila al receptor nuclear llamado NR4A1 (TR3 o Nur77) (Ilustración 7). La función de NR4A1 es necesaria para la muerte autofágica⁴⁰.

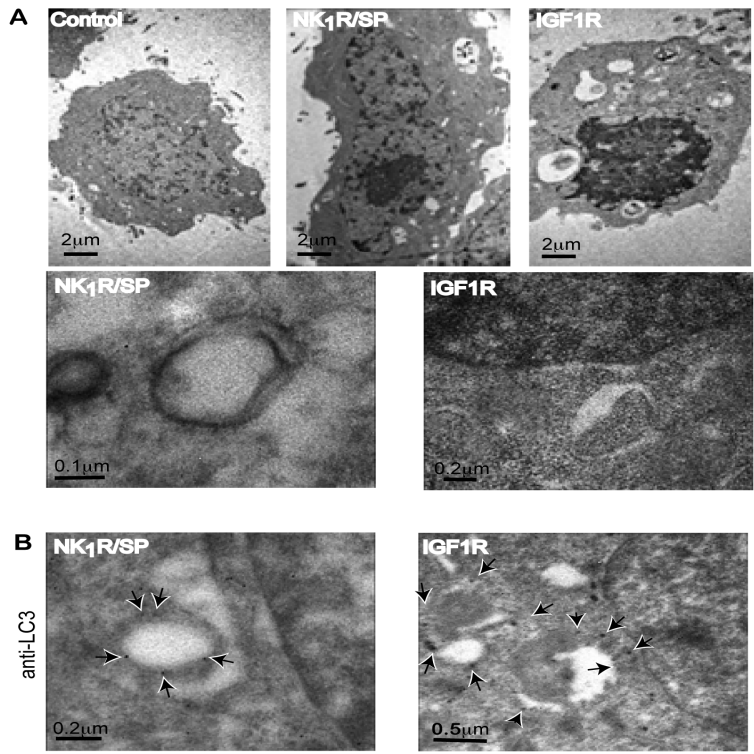


Figura 3. Morfología de las células muriendo con características autofágicas ante la activación de NK₁R/SP observada por microscopía electrónica. Células HEK293T transfectadas con el receptor NK₁R fueron tratadas con SP o bien células transfectadas con IGF1R, que también causa muerte autofágica. En a) se observa el fenotipo de una célula control donde el núcleo, citoplasma y organelos poseen características normales. También se observa la ultraestructura de una célula afectada por SP, se observa una célula hinchada, vesicularización citoplásmica, cambios mínimos en composición nuclear y cromatina. También observamos una célula muriendo por expresión de IGF1R quien presenta material nuclear hiper condensado y vesicularización citoplásmica exacerbada. En los paneles de en medio se aprecian estructuras de doble membrana. En b) se aprecian estructuras de doble membrana cuyo perímetro está marcado por LC3 detectado con oro coloidal. En ninguna célula se observa un fenotipo picnótico, burbujeo de la membrana u otras características apoptóticas.³⁹

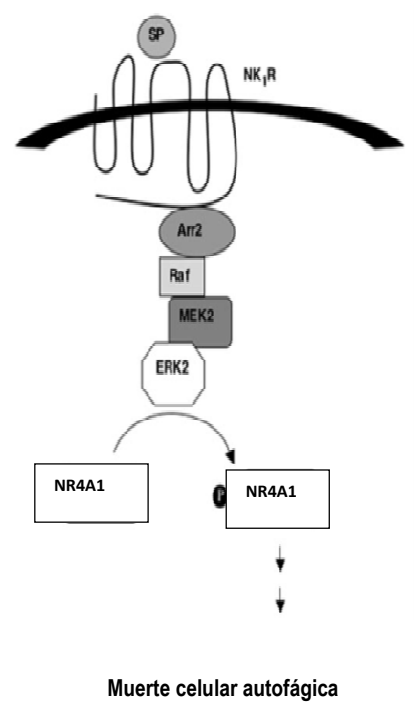


Ilustración 7. Esquema de la cascada de señalización desencadenada por la unión del receptor membranal NK₁R a su ligando, la sustancia P. Modificado de⁴⁰

El Receptor nuclear NR4A1

Los receptores nucleares (NR, en inglés) sensan señales endócrinas y metabólicas a través de hormonas esteroides o tiroideas y en respuesta a ellas regulan la transcripción de genes específicos, por lo que también actúan como factores transcripcionales⁴¹. El receptor NR4A1 forma parte de la superfamilia de receptores nucleares (**NR** por *nuclear receptors*), pertenece a la familia **4**, grupo **A**, siendo el primer miembro (de ahí el **1** en el nombre). Históricamente, NR4A1 se identificó por diversos grupos de investigación en diferentes organismos y contextos celulares, por lo que tiene más de 10 nombres, siendo Nur77 uno de ellos. Esta familia la conforman NR4A1 (Nur77), NR4A2 (Nurr-1) y NR4A3 (NOR-1). Estos factores son de rápida inducción, por lo que se conocen como genes tempranos. Cubren funciones homeostáticas en respuesta a estrés sobre todo regulando la transcripción de genes en el eje hipotálamo- pituitaria- adrenal ⁴². Su expresión correlaciona con tejidos de alta demanda metabólica como músculo esquelético, adipocitos, hígado, cerebro, etc. En el cerebro, NR4A1 es expresado en hipocampo, región fundamental para la formación de memoria espacial y contextual.

Todos los miembros del grupo presentan una secuencia similar en la estructura primaria de la proteína (Ilustración 8). Esta consta de tres dominios. Un dominio de unión a DNA (DBD) y otro de unión a ligando (LBD) ambos altamente conservados (>90% y >60% de similitud, respectivamente) entre los miembros de la familia ^{43,44}. La región DBD incluye dos sitios indicadores de la localización nuclear del receptor (NLS, en inglés), mientras que la región LBD posee tres sitios para la exportación nuclear (NES, en inglés). La región amino terminal de transactivación (TAD) contiene un sitio para la función de activación (AF 1) encargada de reclutar cofactores como p300; el DBD presenta otro dominio activador de función (AF-2) que es capaz de unir cofactores. Canónicamente, el LBD consta de una hendidura conformada por aminoácidos hidrofóbicos con capacidad de unión a un ligando lipofílico. Este último induce cambios conformacionales favoreciendo la unión de cofactores (activadores o represores) a la región Af-2. Sin embargo, esta familia de RNs tiene la particularidad de que el sitio predestinado para la unión a ligando presenta una conformación cerrada y no abierta como otros receptores nucleares. Esta conformación está dada por aminoácidos hidrofílicos que imposibilitan el acceso a cualquier ligando; hasta el momento no se ha reportado ningún ligando natural de estos receptores, por lo que se les denomina huérfanos ⁴⁵.

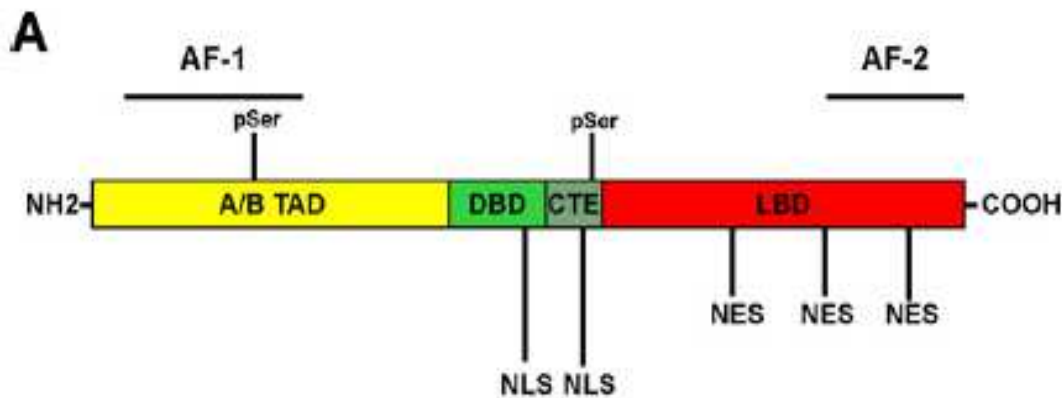


Ilustración 8. Esquema de la estructura primaria proteica de la familia de receptores nucleares NR4A. Observamos el dominio de transactivación en amarillo A/B (A/B TAD) que a su vez contiene al dominio de activación de función 1 (AF-1). En verde el dominio de unión a DNA (DBD). En rojo, en el extremo carboxiterminal, el dominio de unión a ligando (LBD) que a su vez contiene el dominio de activación de función-2. Están ubicadas las señales de localización nuclear (NLS) y las señales de exportación nuclear (NES) y las serinas potenciales blancas de fosforilación (pSER).⁴⁵

Regulación de NR4A1

Al ser este un receptor huérfano, se plantea que su regulación podría estar dada a nivel de transcripción, debido a factores que inducen o reprimen su expresión, o también, puede depender de modificaciones post- raduccionales. En el caso de la regulación río arriba, encontramos proteínas como CREB que regulan la expresión de NR4A1 y NR4A2 en respuesta a lesiones en el hipocampo⁴⁶. Respecto a la regulación postraducciona, se detectaron serinas y treoninas a lo largo del receptor donde es fosforilado en respuesta a estímulos celulares y la duración de esta modificación, depende de los mismos⁴⁵. Un ejemplo es la cinasa RNA S6K (RSK) perteneciente a la familia de las proteínas MAPK, quien fosforila a NR4A1 en el dominio de unión al DNA. Esta fosforilación correlaciona con disminución de la unión a DNA y por tanto disminución de su actividad como factor transcripcional y exclusión del núcleo^{47,45}. Se ha observado que las diferentes fosforilaciones de NR4A1 son importantes en procesos neuronales como la formación de la memoria a largo plazo⁴⁵. Durante la muerte celular autofágica inducida por SP/NK1R, se sabe que ERK2 fosforila a NR4A1 en la treonina 142.⁴⁰ Existen también reportes recientes donde se prueba la posible acetilación del receptor en lisinas del LBD por una histona acetiltransferasa p300. Se sugiere que esta modificación post-traducciona puede evitar la degradación de NR4A1 al competir con los sitios de unión a ubiquitina y de esta manera promover su actividad como factor transcripcional⁴⁸.

NR4A1 es necesario para la muerte inducida por SP/NK₁R

La muerte autofágica inducida por SP/NK₁R requiere de varias proteínas para llevarse a cabo, entre ellas, la presencia del receptor nuclear NR4A1⁴⁰. Este último tiene un pico máximo de inducción a las 3 horas (Fig. 4A). La sobre-expresión de mutantes dominantes negativos del receptor que carecen ya sea del dominio de unión a DNA (NR4A1-dDBD) o del dominio de transactivación (NR4A1-dN152) (Fig. 4B), así como el silenciamiento del mismo por siRNA (Fig.4C), correlacionan con una disminución significativa de la muerte celular al ser comparado con los controles, vector vacío o siRNA GAPDH, respectivamente^{38,40}. En la (Fig. 4D) se corrobora el correcto funcionamiento del RNA interferente siNR4A1. Estos experimentos demuestran que la presencia de NR4A1 es fundamental para que se lleve a cabo la muerte celular por SP/NK₁R.

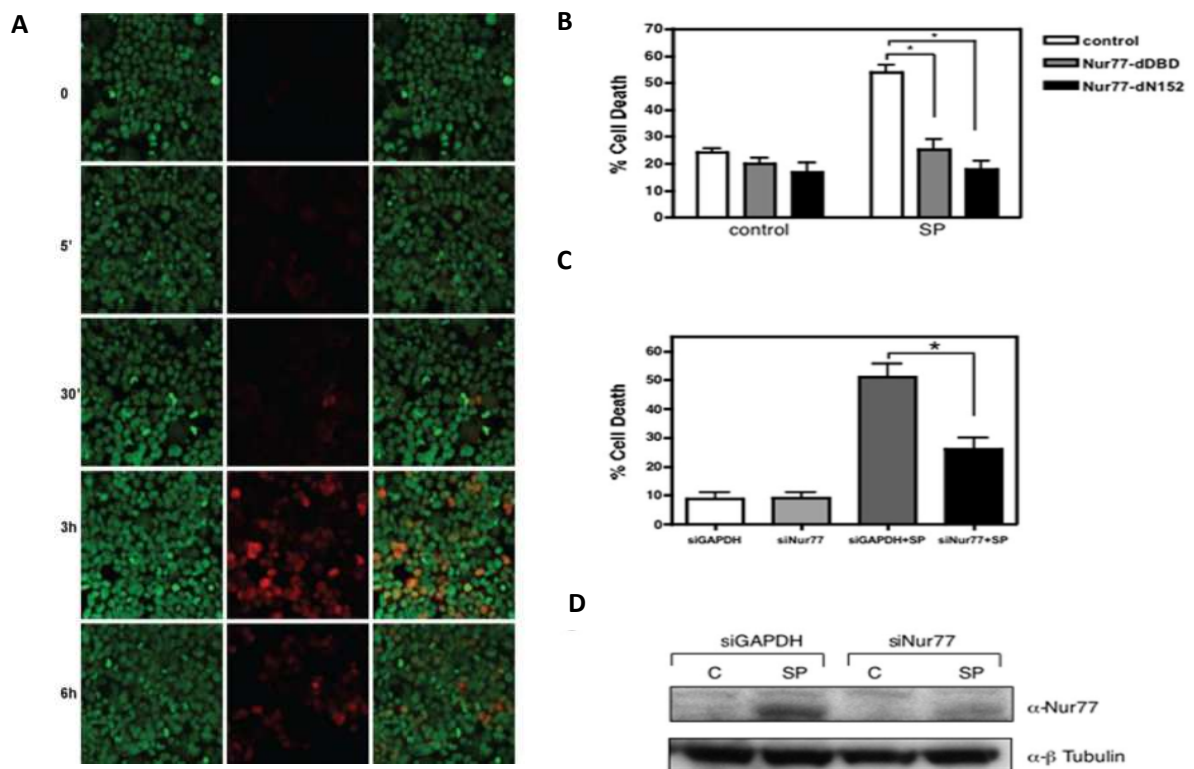


Figura 4. NR4A1 es necesario para la muerte por SP/NK₁R y presenta un pico de expresión a las 3hrs de exposición a SP. Se observa en a) células HEK293 transfectadas con el receptor NK₁R y con tratamiento de SP a los tiempos señalados. En los paneles de la izquierda, los núcleos se tiñeron en verde (sytox- Green) 20X³⁹. Los paneles de en medio muestran la aparición del receptor NR4A1 por inmunofluorescencia en rojo. Los páneles a la derecha muestran el sobrelape de ambos canales. En b) el porcentaje de células muertas en células cotransfectadas con NK₁R y vector vacío o las mutantes dominante negativa de NR4A1 ya sea con delección en el dominio de unión a ligando (NR4A1- dDBD) o sin el dominio de transactivación (NR4A1- dN152); c) el silenciamiento de NR4A1 reduce la muerte celular, siRNA dirigido contra GAPDH como control o NR4A1; Se contaron células muertas teñidas con azul de tripano, tratada o no con SP 100 nM por 24hrs, ambas gráficas son conteos representativos de (n=3). En d) se comprueba la efectividad de los siRNAs contra NR4A1 por Western blot.^{39,40}

SUMO

SUMO, por sus siglas en inglés, quiere decir pequeña molécula modificadora similar a ubiquitina (Small Ubiquitin- like Modifier). Las modificaciones post- traduccionales son cambios en las proteínas causados por moléculas que se enlazan covalentemente a sus sustratos. Existen diversos tipos de modificaciones, tales como ubiquitinación, fosforilación, SUMOilación, acetilación, entre otros. Al ser modificadas post-traduccionales, alteran las propiedades y funciones de las proteínas, haciendo aún más vasto el proteoma. En particular, la SUMOilación puede regular la actividad de una proteína, modificar su localización subcelular, regular su estabilidad, su interacción con otras proteínas e incluso regular la actividad de los factores de transcripción. Generalmente estos cambios se ajustan a las funciones de la célula en respuesta a los estímulos ambientales a los que se enfrentan.⁴⁹ Al parecer una fracción importante de los blancos SUMOilables dentro de la célula se encuentran dentro del núcleo, siendo algunos de ellos factores transcripcionales, se ha reportado que esta modificación repercute de manera importante en el crecimiento y la proliferación celular.^{50,51}

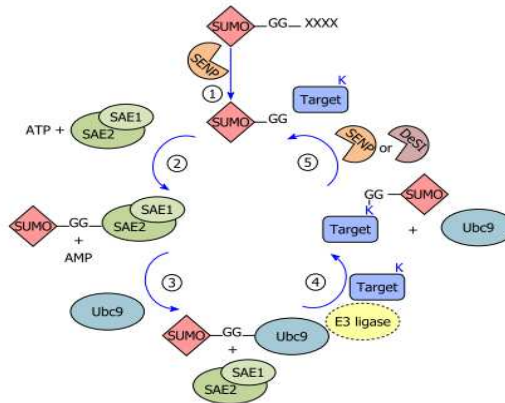


Ilustración 3. Esquema de la conjugación de SUMO a su proteína blanco. Observamos la conjugación de SUMO a su sustrato. En 1, observamos la exposición del motivo diglicina; en 2, observamos la activación de SUMO y la unión a la E1 (SAE1/SAE2). En 3, observamos la unión de sumo a la E2 (Ubc9); en 4, observamos la unión de SUMO a la ligasa E3 y finalmente a su proteína blanco. En 5, observamos la deconjugación de SUMO.⁷¹

ambientes a los que se enfrentan.⁴⁹ Al parecer una fracción importante de los blancos SUMOilables dentro de la célula se encuentran dentro del núcleo, siendo algunos de ellos factores transcripcionales, se ha reportado que esta modificación repercute de manera importante en el crecimiento y la proliferación celular.^{50,51}

SUMO (molécula modificadora similar a ubiquitina) es conjugada a su proteína blanco, de manera similar a la vía canónica de ubiquitina; es decir, vía tres pasos bioquímicos catalizados por tres enzimas fundamentales: E1, E2 y E3 (pasos 2, 3 y 4 en Ilustración 3). Inicialmente, SUMO se encuentra como un precursor inactivo que se procesa para exponer el motivo diglicina de su carboxilo terminal (paso 1, Ilustración 3), necesario para llevar a cabo el enlace. Posteriormente, se activa a SUMO mediante una adenilación en el carbono previamente expuesto con ayuda de ATP (SUMO-AMP) formando un enlace tioéster entre la diglicina de SUMO y una cisteína de la

enzima E1 (paso 2, Ilustración 3). Hay una gran diversidad de enzimas E1, sin embargo, en algunos vertebrados, incluyendo pollos y mamíferos, E1 es un heterodímero formado por SAE1/SAE2. Trás la activación de SUMO, éste es transferido a la enzima de conjugación o E2 (UBC9) mediante un enlace tioéster entre la diglicina de SUMO y la cisteína de la E2 (paso 3, Ilustración 3). Finalmente, la conjugación al sustrato ocurre mediante un enlace covalente entre la diglicina de SUMO y el grupo amino (épsilon) del residuo de lisina en la proteína blanco, paso catalizado por la enzima ligasa E3. Existen proteínas SENPs encargadas de desconjugar a SUMO dejando a moléculas de SUMO libre para iniciar un nuevo ciclo de conjugación (paso5, Ilustración3). La conjugación y desconjugación de SUMO a proteínas específicas es un proceso finamente regulado y altamente dinámico.^{50,52}.

La SUMOilación tienen un papel importante en la lucha contra patógenos de la célula por lo que SUMO representa una amenaza y una presión selectiva importante para patógenos intracelulares.

En respuesta a distintas presiones selectivas, los virus, siendo patógenos, han evolucionado una diversidad de maneras para manipular el metabolismo celular a su favor. Uno de sus blancos es la transcripción de proteínas. Dado que la SUMOilación es una modificación importante que repercute en la transcripción de proteínas, ciertos virus son capaces de evitar la sumoilación como parte de su patogeneicidad. Gam1 es una proteína viral que evita la sumoilación (Boggio y Chiocca, 2005).

Proteína Viral Gam1 y su papel respecto al receptor NR4A1

Gam1 es una proteína del adenovirus de pollo, CELO (huérfano letal de embrión de Pollo). Inicialmente, se caracterizó en un contexto antiapoptótico en el cual el virus utiliza esta proteína para evitar que la célula infectada muera, promoviendo además su replicación⁵³. Acorde con esto, Gam1 es esencial para la supervivencia del virus, ya que la ausencia de Gam1 muestra disfuncionalidades en la replicación viral⁵⁴.

Interesantemente, una de las maneras en las que Gam1 manipula a la célula a su favor es inhibiendo la SUMOilación. La presencia de Gam1 induce la degradación de la E1 de la SUMOilación, SAE1 (Fig. 5). Esto lo hace reclutando a SAE1 y a ubiquitina, gracias a que posee un motivo de unión a proteínas de la familia CRL (cullin RING ligasas), Cul2 y Cul5, que son enzimas E3 características de la ubiquitinación. Cul2 y Cul5 comparten una subunidad adaptadora, heterodimérica: EloB y EloC (elonguinas) que ayudan al reclutamiento específico de la proteína blanco, en este caso SAE1. De la misma manera recluta a la enzima E3 de la ubiquitinación promoviendo la ubiquitinación y consecuente degradación de la proteína blanco, SAE1. La degradación de SAE1 parece inducir también la degradación de SAE2, la otra subunidad que conforma la E1 de la sumoilación y de la enzima E2 de la SUMOilación, Ubc9. Es así como Gam1 logra de manera efectiva un efecto negativo sobre la sumoilación global de la célula^{54,55}.

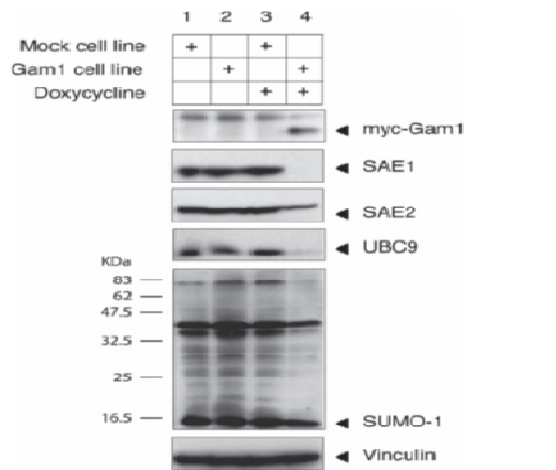


Figura 5. Gam1 inhibe la SUMOilación de todas las proteínas por SUMO-1. Observamos un western blot donde se muestra que las líneas celulares que poseen el gen de Gam1 bajo un promotor responsive a doxiciclina, no presentan las enzimas E1 y E2 de la SUMOilación (SAE1/ SAE2 y UBC9, respectivamente). Así mismo se observa que la línea celular que expresa Gam1 también presenta una disminución en la SUMOilación por SUMO-1.⁵⁵

En estudios previos se observó que NR4A1 se SUMOila durante la activación de la muerte autofágica, sugiriendo que posiblemente se modificaba su actividad transcripcional y su localización intracelular, por lo cual se planteó la hipótesis de que el estado SUMOilado le confiere la actividad promotora de la muerte autofágica. Para poder estudiar el efecto de la SUMOilación de NR4A1, hemos utilizado a Gam1 como herramienta para inhibir la SUMOilación. En el laboratorio, se comprobó que Gam1 disminuye la cantidad de NR4A1 SUMOilado durante la muerte inducida por SP/NK₁R, mientras que la co-expresión de una mutante inactiva de Gam1 no tiene efecto (figura 6 de Sánchez Carbente M. R., *et al*, por publicarse).

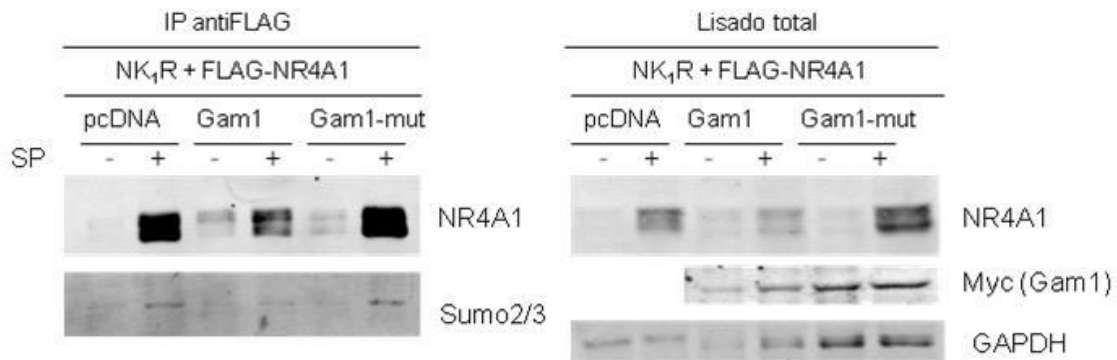


Figura 6. Sumoilación de NR4A1. Inmunoprecipitación de NR4A1 utilizando α -Flag en ausencia o presencia de SP por 3hrs (+). Se co-transfectó a la proteína myc-Gam1 como inhibidor de la SUMOilación; en su presencia se observa una disminución de SUMO-NR4A1 que se recupera cuando se utiliza una mutante inactiva de Gam1 (Sánchez- Carbente M.R., *et al*, por publicarse).

La muerte celular inducida por SP/NK₁R es inhibida por Gam1

Se formuló entonces la hipótesis de que la SUMOilación de NR4A1 le confiere la habilidad para inducir muerte autofágica. Por lo tanto, inhibir la SUMOilación debería disminuir la muerte de las células. Se observó que al cotransfectar Gam1 junto con el receptor NK₁R y agregar SP, la viabilidad de las células aumentaba, es decir, disminuía el porcentaje de células muertas con respecto al control co-transfectado con un vector vacío (Fig. 7 Zárraga, 2012). Estos resultados indican que la SUMOilación juega un papel importante en la muerte celular autofágica; sin embargo no demuestra que es específicamente la SUMOilación de NR4A1 la responsable. Para ello, es necesario inhibir específicamente la SUMOilación de NR4A1, por lo que se buscó obtener mutantes de NR4A1 no SUMOilables.

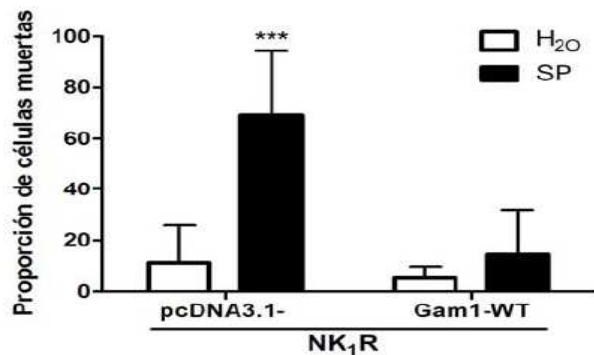


Figura 7. La muerte inducida por SP/NK₁R es inhibida por Gam1. Se observa la proporción de células muertas de células transfectadas con NK₁R, NK₁R y Gam1, en presencia o ausencia de SP (Zárraga, 2011).

Se hicieron estudios *in Silico* (Fig. 8) donde se buscaron sitios consenso para la SUMOilación (Ψ KXE) usando el programa Gene Constructor. Se alinearon las secuencias protéicas de los tres miembros de la familia NR4A (Nur77, Nurr1 y NOR-1) para saber si estaban conservados los sitios predichos. En particular, se detectaron tres sitios potenciales de SUMOilación. Partiendo de esta información, se generó una mutante triple de los sitios K102, K558 y K577, sustituyendo las lisinas (K) por argininas(R), de manera que la nomenclatura para la mutante del receptor es la siguiente: NR4A1-K102,558,577R (Zárraga, 2011); de aquí en adelante nos referiremos a la triple mutante como NR4A1mut. Teniendo en cuenta la similitud bioquímica entre los procesos de conjugación tipo ubiquitinación de la maquinaria central de la autofagia y la SUMOilación, también es posible que Gam1 este inhibiendo la muerte autofágica al interferir con la maquinaria autofágica directamente y no necesariamente a través de inhibir la SUMOilación de NR4A1, por lo que es necesario distinguir entre estos dos posibles mecanismos de acción de Gam1.

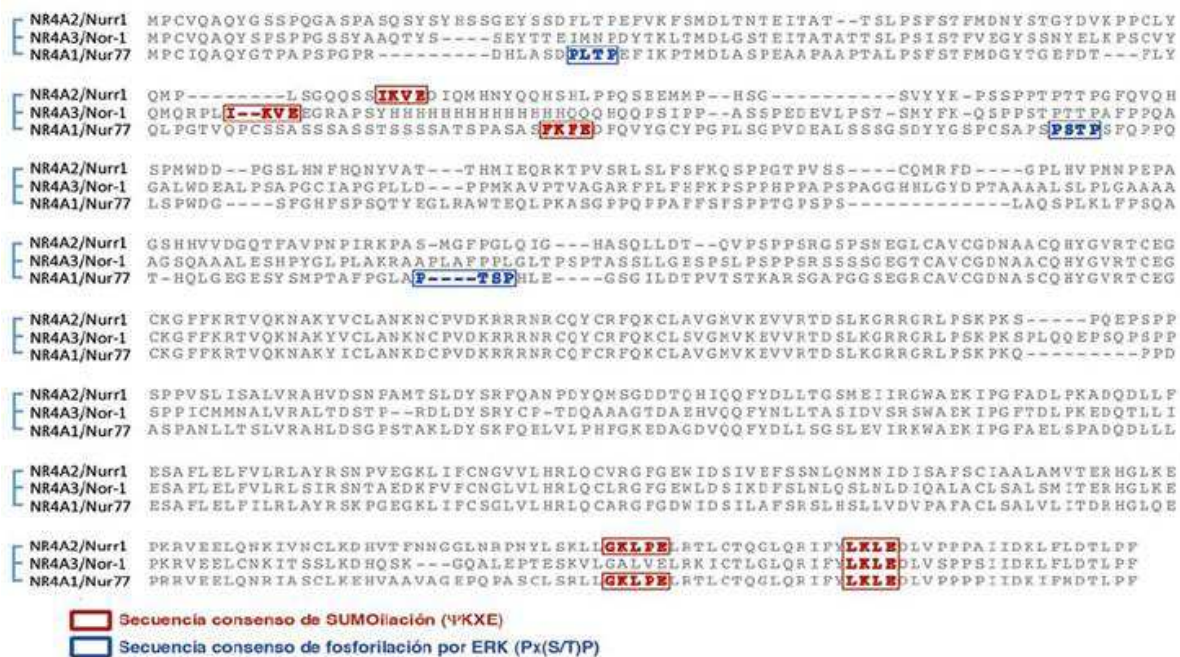


Figura 8. Se muestran los posibles sitios de SUMOilación para los miembros de la familia NR4A. En rojo están marcados los sitios consenso potenciales SUMOilables y en azul los sitios de fosforilación (Zárraga, 2011).

VII. JUSTIFICACIÓN

Desregulaciones en la autofagia están implicadas en diferentes patologías como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, entre otras ^{56,57}, desórdenes en el hígado, intestino y el músculo ⁵⁸, así como en la invasión de patógenos ⁵⁹. Por lo tanto, entender 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.

El estudiar la función de la SUMOilación de NR4A1 en este modelo de muerte autofágica, nos acerca un paso más a entender la fina regulación de este receptor y podríamos plantear preguntas respecto a su regulación/desregulación en otros procesos en los que se ha visto involucrado, como son la proliferación celular, muerte apoptótica, regulación metabólica, etc.

VIII. HIPÓTESIS

Gam1 inhibe la muerte autofágica al inhibir la SUMOilación del receptor nuclear NR4A1.

IX. OBJETIVOS

Objetivos Generales

1. Determinar el papel de la SUMOilación de NR4A1 en la muerte celular autofágica utilizando a la proteína viral Gam1, un inhibidor de conjugaciones tipo ubiquitina

Objetivos Particulares

1. Determinar el papel de Gam1 en el procesamiento de complejos tipo ubiquitina de la maquinaria central de la autofagia, Atg12-Atg5 y LC3-PE.
2. Establecer un método para el silenciamiento de NR4A1 endógeno que permita estudiar la función de NR4A1 exógeno y poder observar los fenotipos mutantes.
3. Determinar si la mutante triple de NR4A1 en sitios potenciales de SUMOilación pierde la capacidad de inducir muerte celular autofágica en comparación con NR4A1 silvestre.

X. METODOLOGÍA

Biología Molecular

Preparación de Bacterias Competentes

1. Sembrar un preinóculo de células DH5 α a 25°C en agitación en matraz con 250 ml de LB e incubar durante la noche 12-16 h.
2. La mañana siguiente colocar el matraz en una incubadora a 37°C en agitación.
3. Medir densidad óptica a 600nm cada 30 minutos. Al alcanzar la densidad óptica de 0.6 colocar en hielo.
4. Centrifugar a 2500 g, 10 minutos a 4°C
5. Resuspender la pastilla celular en 80 ml de Buffer TB frío, cuidadosamente
6. Incubar en hielo 10 minutos
7. Centrifugar a 2500 g, 10 minutos a 4°C
8. Resuspender la pastilla en 20 ml buffer TB frío, cuidadosamente
9. Agregar 1.4 ml de DMSO (7% final)
10. Incubar en hielo 10 minutos
11. Alicuotar a las bacterias resuspendidas en DMSO en tubos eppendorf, 600 μ l/tubo y sumergir inmediatamente en Nitrógeno líquido parando los tubos con pinza antes de soltarlos para que no exploten.
12. Almacenar a -80°C.

Transformación de Bacterias Competentes

1. Descongelar células en hielo.
2. Tomar 200 μ L de una alícuota de células competentes DH5 α y agregar 1ng de plásmido
3. Incubar 30 minutos en hielo
4. Dar choque térmico de 30 segundos a 42°C. Terminado el pulso incubar en hielo inmediatamente.
5. Agregar 0.8 ml de medio SOC (por sus siglas en inglés, medio de crecimiento super óptimo)
6. Recuperar 45 min a 37°C en agitación
7. Platear diluciones (10 μ l, 100 μ l y el restante) en cajas con medio LB solidificado y con el antibiótico pertinente.

Purificación de Plásmido

1. La purificación de plásmidos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del Kit Qiagen No. Cat. #12663.

Biología Celular

En este trabajo se utilizaron células HEK293T que son células de riñón de embrión humano que han sido inmortalizadas, utilizando el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40), lo cual además permite la expresión eficiente de vectores que contienen elementos de SV40 que facilitan la transfección.

Mantenimiento Celular

Se parte de un plato de cultivo de 10 cm con aproximadamente 10×10^6 células (90% confluyente):

1. Aspirar el medio con bomba de vacío.
2. Lavar con 3ml de PBS a temperatura ambiente, dejándolo caer cuidadosamente sobre la pared del plato.
3. Aspirar el PBS a través de la bomba de vacío
4. Agregar 1ml de tripsina 0.25% por cada plato de cultivo de 10 cm sobre las células para separarlas del plato y disgregarlas. Mover la caja de lado a lado para asegurar que la tripsina alcance a cubrir la superficie e incubar durante 3 minutos a 37°C.
5. Añadir 4 ml de medio DMEM suplementado con suero, previamente calentado a 37°C, para inactivar la tripsina y disgregar las células físicamente pipeteando lentamente el medio.
6. Transferir el disgregado a un tubo Falcon de 15 ml (Corning #430790).
7. Tomar una alícuota de 10 μ L de la solución celular y añadir 10 μ L de azul de tripano. Contar con cámara de Neubauer tomando en cuenta cinco cuadrantes de la cuadrícula (cuatro de las esquinas y el del centro). Dividir el total de células entre 5 para saber el número de células por cuadrante. Luego multiplicar por 2 y luego por 10,000, ya que en un cuadrante cabe 0.1 μ L, para saber cuántas células hay en un ml; luego multiplicar por el número de ml totales en el que están resuspendidas las células de la muestra, o sea 5 ml.
8. Centrifugar 4 minutos a 1000 g.
9. Aspirar el medio con la bomba de vacío, dejando la pastilla intacta.
10. De acuerdo al conteo celular, resuspender las células en los ml necesarios para obtener una suspensión de 1×10^6 células/ml de medio DMEM suplementado.

11. Tomar un ml (para sembrar 1 millón de células) y agregar 9 ml más de medio DMEM suplementado; pipetear para homogeneizar.
12. Sembrarlas en una caja de 10 cm. Incubar a 37°C y 5% de CO₂ en humedad.

Congelación de líneas celulares

1. Disgregar las células de acuerdo a los pasos de mantenimiento de la línea celular.
2. Resuspender la pastilla en el volumen necesario para obtener una densidad celular de 6×10^6 células/ml.
3. Agregar la misma cantidad de medio de congelación 2X y de células. Mezclar cuidadosamente y hacer alícuotas de 1ml en crioviales (Corning #2028), previamente etiquetados con tipo celular, fecha y densidad celular (3×10^6 células/vial).
4. Congelar lentamente: mantener a -70°C durante 24hrs y posteriormente transferir a nitrógeno líquido para almacenar por tiempos prolongados.

Descongelación de líneas celulares

1. Incubar el criovial durante 1 minuto a 37°C en baño de agua.
2. Tomar el mililitro de suspensión celular dentro del criovial y resuspenderlo en 4ml de medio DMEM fresco suplementado y precalentado a 37°C.
3. Mezclar la suspensión pipeteando el medio cuidadosamente y centrifugar 4 minutos a 1000 g
4. Aspirar el sobrenadante con bomba de vacío y resuspender en 10 ml de medio DMEM suplementado para un criovial que contenga 1×10^6 células.
5. Sembrar en un plato de cultivo de 10 cm.

Transfección de DNA

Transfección transitoria por CaCl₂

DÍA1: Sembrar el número de células requeridas. En este trabajo utilizamos mayoritariamente cajas de 6 pozos de 35 mm (Corning #430165); por lo que se siembran 5×10^5 células/pozo en 2 ml de medio DMEM suplementado sin antibióticos.

DÍA2: Previo a la transfección reducir el volumen del cultivo a la mitad. En el caso de los pozos de 35 mm se reduce el volumen de 2 ml a 1 ml.

1. En un tubo eppendorf de 1.5 agregar para cada mezcla los componentes en las proporciones indicadas en la Tabla1.
2. Mezclar perfectamente el agua, DNA y CaCl_2 e incubar 5 minutos. Posteriormente agregar el HBS2X.

Proporciones DNA:CaCl₂		
Soluciones	Platos 35mm	
	1 plásmido	Co-transfección
Agua grado cultivo	38.75µL	La necesaria para aforar a 100µL
DNA (1µg/µL)	5µL	3µg (por cada plásmido)
CaCl ₂ 2M	6.25µL	6.25µL
HBS 2X	50µL	50µL
Volumen Total	100µL	100µL

Tabla 1. Preparación de soluciones de acuerdo a la metodología de transfección por CaCl para pozos de 35mm. Nota: Las proporciones cambian de acuerdo al volumen en el cual se depositará la mezcla final, según el área del pozo utilizado.

3. Incubar 2 minutos a 37°C
4. Agregar la mezcla al cultivo, goteando y agitar cuidadosamente el plato para homogeneizar la mezcla una vez en el medio de cultivo.
5. Incubar 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ en humedad.
6. Cambiar medio de transfección por medio DMEM suplementado sin antibióticos previamente calentado a 37°C.
7. Normalmente se dejan 24 horas para procurar la expresión del transgen.

Transfección transitoria por PEI (polietilenimina)

DÍA 1: Sembrar el número de células requeridas en medio DMEM suplementado sin antibióticos.

DÍA 2: Reducir el volumen del medio a 1 ml.

1. Preparar mezclas de DNA y PEI (1µg/µl) utilizando la proporción recomendada 1:3, DNA:PEI respectivamente. Las mezclas de DNA y PEI se preparan en tubos separados

acuerdo a la siguiente tabla, que considera medio pozo extra de los que se usarán para el experimento evitando así la pérdida de solución por efecto del pipeteo y asegurar que les toquen los mismos μl de mezcla a todos

los pozos:

Proporciones DNA:PEI		
<i>3.5 Pozos de 35mm</i>		
Soluciones	Mix DNA	Mix PEI
OPTIMEM (Gibco 11058021)	147 μL	164.45 μL
DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	3.5 μL	-
PEI	-	10.5 μL
Vol. Total	175 μL	175 μL

Tabla 2. Preparación de soluciones para transfección por PEI de un pozo de 35mm. Los volúmenes cambian de acuerdo al volumen final en el cual se tienen sembradas las células. Las proporciones de DNA: PEI son independientes al volumen del pozo.

2. Agregar la mezcla de PEI a la mezcla de DNA en proporción 1:1 e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Gotear 100 μl de la mezcla DNA: PEI por pozo de 35mm. Agitar cuidadosamente el plato para homogeneizar la mezcla una vez en el medio de cultivo.
4. Cambiar medio de transfección por medio fresco DMEM suplementado sin antibióticos 4 horas post-transfección.
5. Esperar al menos 24 horas post-transfección para comenzar los tratamientos celulares. De esta manera se permite una correcta expresión del transgen.

Transfección de DNA/RNAi

Transfección transitoria por Lipofección

DÍA1: Sembrar 1.5×10^5 células en cajas de 12 pozos c/u de 22mm (Corning #3513) en un ml de medio DMEM suplementado sin antibióticos.

DÍA1: Reducir el volumen del cultivo a la mitad, en este caso a 500 μ l

1. En tubos eppendorf de 1.5 ml mezclar las siguientes soluciones. La mezcla de DNA/RNA se prepara independiente de la Lipofectamina 2000:

Proporciones Lipofectamina:DNA:RNA		
Pozo de 22mm		
Soluciones	Plásmido: siRNA	Lipofectamina
OPTIMEM	El necesario para aforar a 25 μ L	22 μ L
DNA (1 μ g/ μ L)	1 μ L	-
siRNA	100 pmol (final)	-
Lipofectamina 2000 (Invitrogene #11668)	-	3 μ L
Volumen total	25 μ L	25 μ L

Tabla 3. Proporciones utilizadas para la lipofección de plásmidos y RNAs interferentes en células de mamíferos. Nota: se debe contemplar un pozo extra cuando se transfectan varios pozos para evitar la pérdida de solución por efecto del pipeteo y asegurar que les toquen los mismos μ l de mezcla a todos los pozos.

2. Una vez preparadas las mezclas, incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Agregar la mezcla que contiene la Lipofectamina a la mezcla de plásmido/siRNA en proporción 1:1. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Gotear 50 μ l de la mezcla final a cada pozo de 22 mm, agitar cuidadosamente el plato para homogeneizar la mezcla una vez en el medio de cultivo.
5. Cambiar el medio de transfección por medio DMEM suplementado sin antibióticos 4 horas después.
6. Esperar al menos 24 horas para dar tiempo a una abundante expresión del transgen y el silenciamiento de la proteína blanco.

Secuencias de siRNAs contra la región 3' UTR del mRNA de NR4A1wt		
<i>Id. de la secuencia</i>	<i>Secuencia Blanco (Gene Bank NM_002135)</i>	<i># Nucleótidos</i>
siRNAa	GCCCAGUGCUGCUGUAAUUUU	2401- 2422
siRNAb	CCACAUGUACAUAAACUGUUU	2529- 2550
siRNAc	GCGCCGUGCUGUAAUAAGUU	2383- 2404
siRNAd	GUACAUAAACUGUCACUCUUU	2535- 2550

Tabla 4. Secuencias correspondientes a los siRNAs utilizados contra la región 3'UTR de NR4A1wt, los siRNAs se mandaron sintetizar a Thermo Scientific Dharmacon.

Modelo de muerte inducida por SP/NK₁R

DÍA 1: Sembrar el número correspondiente de células de acuerdo a la planeación experimental. En este trabajo se sembraron cajas de 12 pozos de 22mm, cada uno con 1.5×10^5 células. Cada condición experimental deberá hacerse por triplicado.

DÍA 2: Transfectar transitoriamente la construcción codificante para NK₁R o bien el vector vacío pcDNA3.1 como control negativo.

DÍA 3: 24 horas post- transfección, agregar Sustancia P a una concentración final de 100 nM o agua grado cultivo como su control negativo. Las siguientes combinaciones deben de cumplirse: 1) NK₁R + SP; 2) NK₁R + agua; 3) pcDNA3.1 + SP; 4) pcDNA3.1 + agua.

DÍA 4: 24 horas posteriores a la adición de SP se determina la viabilidad celular ya sea por exclusión de azul de tripano o por actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Inducción e inhibición del flujo de la autofagia celular

DÍA 1: Sembrar células

DÍA 2: Transfectar células

DÍA 3: Aplicación de tratamientos diluyendo en el medio donde se encuentran sembradas las células de acuerdo a los tiempos en la Tabla 5. Se utilizó Cloroquina 40 μ M disuelta en agua (Sigma Aldrich), rapamicina 40 μ M disuelta en DMSO (Sigma Aldrich R8781) y Trehalosa 100 mM disuelta

en agua (Sigma Aldrich); cada uno con su vehículo correspondiente como control.

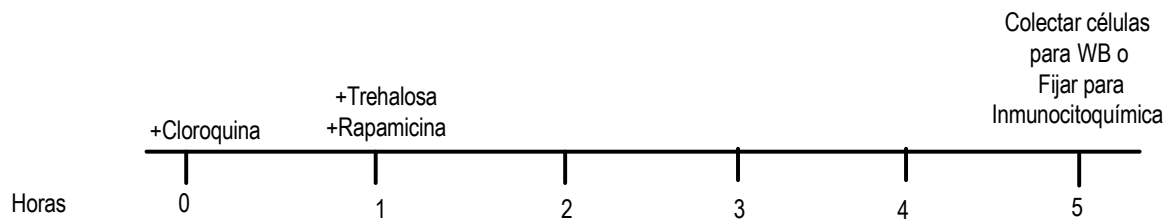


Tabla 5. Protocolo temporal de tratamientos para la manipulación de la autofagia en células HEK293T.

Determinación de viabilidad celular

Por exclusión de azul de tripano

1. Agitar ligeramente el plato de cultivo que contiene las células a las cuales se les determinará viabilidad.
2. Extraer el medio con una pipeta y transferirlo a un tubo eppendorf de 1.5 ml
3. Centrifugar a 2000 g durante 4 minutos en microcentrífuga.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender en 50 μ de azul de tripano 0.04% en PBS (se diluye a partir del stock al 0.4% Life Technology Cat 15250.061), filtrado para eliminar precipitados.
5. Cuantificar las células que incorporaron el azul de tripano (muertas) en un hemocitómetro y contar el número de células totales en los cinco campos del hemocitómetro. Extrapolar para conocer el número total de células, considerando el volumen total de la muestra.

$$\% \text{ de Células Muertas} = \text{muertas} * \frac{100}{\text{número total}}$$

Por actividad extracelular de la enzima LDH

Este es el protocolo llevado a cabo para células adherentes que se separan con facilidad del plato de cultivo:

1. Agitar ligeramente el plato de cultivo que contiene las células a las cuales se les determinará la viabilidad:
2. Absorber el sobrenadante y transferirlo a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
3. Centrifugar a 2000g durante 4 minutos en la microfuga.
4. Retirar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo eppendorf de 1.5 ml.
5. Agregar a las células del plato 1 ml de Buffer de Lisis 1X y dejarlo actuar 20 minutos.
6. Transferir la suspensión celular a los tubos eppendorf donde se hizo la primera centrifugación.

7. Dejar 10 minutos más para que el Buffer de lisis actúe sobre las células del pellet de la primera centrifugación.
8. En una placa de 96 pozos colocar cada muestra del sobrenadante y de la lisis celular por triplicado.
9. En la misma placa agregar como controles medio DMEM y Buffer de Fosfatos también por triplicado.
10. Antes de la lectura agregarles a todos los pozos el Buffer de Fosfatos preparado al momento.
11. Leer en un luminómetro (en este trabajo se utilizó el LUMIstar OMEGA de Labtech) a 340 nm, ya que a esa longitud se detecta NADH. Iniciar los ciclos con 5 minutos de agitación.
12. Hacer lecturas cada 75 segundos; registrar al menos 40 lecturas.
13. Graficar los datos obtenidos. Se observará una recta de pendiente negativa cuya inclinación dependerá de la pérdida de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y su abundancia en el medio.

$$LDH(U/L) = \frac{\left(\frac{\Delta A}{t}\right) V \cdot FD}{6.3 \cdot v \cdot d}$$

U: unidades

ΔA : Diferencia de absorbancia $A_1 - A_0$

t: tiempo (min)

V: Volumen total de reacción (0.2 ml)

D: factor de dilución (1000 ml)

6.3: Factor de extinción de NADH

v: volumen de NADH (0.1 ml)

d: distancia de la cubeta que recorre el rayo de luz (1.25cm)

Nota: Esta medida de viabilidad parte del principio de que células en condiciones normales mantienen esta enzima compartimentalizada dentro de la célula, ya sea en citoplasma o en mitocondria. Cuando la integridad celular se ve amenazada, esto ocasiona la pérdida de la permeabilidad de la membrana plasmática, lo cual permite la liberación de enzimas al espacio extracelular. De ahí que la concentración de la enzima LDH en el espacio extracelular es un reportero de viabilidad celular y tisular ampliamente utilizado.

Bioquímica

Obtención de extractos de proteínas

1. Aspirar el medio en el que se encuentran las células y agregar 1 ml de PBS 1X frío (4°C)

2. Despegar las células del pozo de 35 mm mecánicamente, utilizando un raspador (CLS3010) y transferirlas a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Mantener los tubos en hielo, es importante que desde este momento todo se haga en frío para evitar la degradación de la proteína.
3. Centrifugar 5 minutos a 2.5 g (rotor F2402) a 4°C para eliminar restos de medio de cultivo.
4. Desechar el sobrenadante.
5. Resuspender la pastilla resultante en 1 ml de PBS frío.
6. Repetir pasos 2 y 3.
7. Conservar la pastilla y resuspender en 50 a 100 μ l de buffer de lisis dependiendo del tamaño del pellet. Incubar 15 minutos en hielo.
8. Sonicar 3 pulsos de 20 segundos con ondas de amplitud 2 (Minisonix, sonicator, Ultrasonic processor; Modelo S3000). Esto es para fragmentar las estructuras celulares no lisadas por el buffer, sobre todo el DNA.
9. Centrifugar 15 minutos a Vmax (17530g en rotor F2402 Beckman) a 4°C.
10. Recuperar el sobrenadante y cuantificar la proteína (μ g/ μ l).

Cuantificación de Proteína

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico de Bradford cuyo principio se basa en la afinidad que posee el colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 para unirse a aminoácidos básicos (*i. e.* Arginina) o aromáticos. El colorante existe en dos formas, libre o formando un complejo unido a proteínas esto son color café o azul, respectivamente. El complejo formado por la unión del colorante presenta un pico máximo de absorción (595 nm) distinto al del colorante libre (465 nm). Las propiedades de este complejo hacen posible la cuantificación ya que la cantidad de proteína es proporcional a la cantidad azul detectado en solución. Este método permite la detección de 1- 15 μ g de proteína.

1. Diluir Bradford (BioRad #223-9950) 1:4 utilizando agua destilada para obtener un volumen de 20 ml.
2. Preparar una solución de la proteína seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) a 1 μ g/ μ l en agua bidestilada.
3. Preparar una curva estándar utilizando concentraciones conocidas de BSA y comparar con la proteína de interés. Preparar ambas curvas de acuerdo a la siguiente tabla:

Cuantificación de Proteína de acuerdo al Método de Bradford					
Curva Estándar					
#	Solución de Bradford (μL)	Agua destilada (μL)	Buffer de Lisis (μL)	BSA [1μg/μL] (μL)	Extracto de Proteína (μL)
A	980	18	2	0	-
B	980	16	2	2	-
C	980	14	2	4	-
D	980	12	2	6	-
Análisis de Muestras					
1	980	18	-	-	2
2	980	18	-	-	2
N	980	18	-	-	2

Tabla 6. Preparación de cubetas de proteína y curva estándar para cuantificación utilizando el método de Bradford.

4. Mezclar e incubar 5 minutos para permitir que el Bradford reaccione con la proteína. Medir la absorbancia de la curva estándar y de las muestras en un espectrofotómetro a 595nm.
5. Graficar las absorbancias de la curva estándar colocando en el eje de las X las concentraciones conocidas y en el eje de las Y las absorbancias obtenidas.
6. Hacer una regresión lineal y obtener la ecuación de la recta correspondiente a la curva estándar ($y=mx+b$).
7. Utilizar la pendiente (m) de esa recta para obtener las concentraciones (X) de las muestras correspondientes a los extractos de proteína.
8. Alicuotar la proteína desde 40 μg/tubo. Almacenar a -80°C para evitar la degradación de la proteína.

Western Blot

Electroforesis en gel desnaturante de acrilamida con dodecil sulfato (SDS-PAGE)

1. Preparar geles desnaturantes para vidrios de 1.5 mm de grosor, 13.3cm de largo por 8.7cm de ancho(BioRad) de acuerdo a la siguiente tabla:

Proporciones utilizadas en geles desnaturantes			
Reactivos	Gel Separador (10ml)		Gel Concentrador (3ml)
	10% (ml)	15% (ml)	5% (ml)
Agua	4.0	2.3	2.1
A/B 30%	3.3	5.0	0.5
Tris-HCl 0.5M pH8.8	2.5	2.5	-
Tris-HCl 1.5M pH6.8	-	-	0.76
SDS 10%	0.1	0.1	0.03
APS 10%	0.1	0.1	0.03
TEMED	0.004	0.004	0.003

Tabla 7. Preparación de geles desnaturantes. En este trabajo se utilizaron geles del 15% para detectar la presencia de LC3-I, LC3-II y geles de 10% para detectar tanto el conjugado de Atg12-Atg5 y Atg12 individual, P62 y NR4A1.

2. Montar el cassette a lo ancho sobre las esponjas, en conjunto sostendrán y evitaran el derrame de la mezcla para asegurar la polimerización del gel esperada.
3. Preparar la mezcla para el gel separador de acuerdo a las proporciones de la Tabla 2 y verter la mezcla en el cassette. Agregar 500 µl de isopropanol sobre la mezcla para alinear el gel. Dejar polimerizar, alrededor de 20 min. Se recomienda dejar una muestra de mezcla en el tubo donde se preparó (50 ml Corning #430828) para comprobar la polimerización.
4. Decantar el isopropanol y absorber el resto con una tira de papel absorbente Whatman (Whatman International Ltd. #3001-917).

5. Preparar la mezcla para el gel concentrador de acuerdo a las proporciones indicadas en la Tabla 2. Verter la mezcla en el cassette sobre el gel separador e introducir el peine paralelo a los vidrios para evitar la formación de burbujas. Esperar alrededor de 20 min a que polimerice.
6. Una vez polimerizado el gel concentrador, los geles pueden almacenarse en humedad y a 4°C hasta 1 semana; sin gel concentrador pueden guardarse de 2 a 3 semanas.
7. Preparar las muestras mezclándolas con Buffer de Carga desnaturizante para proteínas y aforar a un volumen igual con Buffer de Lisis, de ser necesario. Generalmente se carga al menos 30 µg de proteína por carril para una mejor detección. Sin embargo, hay proteínas como LC3 que se encuentran en baja abundancia en las células por lo que necesita cargar una mayor cantidad de proteína, hasta 90 µg de proteína por carril para una mejor detección.
8. Una vez preparadas las muestras se incuban 5 min a 95°C.
9. Montar el gel en el cassette que lo sostendrá durante la electroforesis, introducirlo a la cámara electroforética y llenar la cámara con Buffer de Corrida 1X. Remover los peines hasta que los geles estén sumergidos en Buffer de corrida para que deslice adecuadamente y así evitar que los carriles separadores se desprendan junto con el peine.
10. Cargar las muestras y el marcador de proteínas (2 µL) (PAGE Ruler Plus Prestained Protein Ladder Fermentas #SM1811) en los carriles correspondientes del gel. Todos los carriles deben tener la misma cantidad de proteína. Los carriles libres de muestra deben ser cargados con la misma cantidad de Buffer de Lisis y volumen total que las muestras para asegurar la migración de las muestras sea equidistante a partir de su entrada al gel separador.
11. Correr el gel a 100V. Para la visualización de LC3 es importante mantener este voltaje ya que la banda de LC3 se vuelve difusa a altos voltajes. Parar la corrida cuando el frente de corrida llegue al extremo inferior del gel. Toma aproximadamente 1:30 hrs.

Transferencia de proteínas de gel de poliacrilamida a membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride):

1. Cortar la membrana de PVDF (Inmobillon-FL, Millipore #IPFL00010 para revelado mediante Odyssey (infrarrojo); o Inmobillon-P, Millipore # IPVH00010 para revelados por quimioluminiscencia) del tamaño exacto del gel y prehumedecerla en metanol al 100%,

para activarla. Desde este momento debe cuidarse que la membrana siempre se mantenga húmeda.

2. Prehumedecer esponjas y papeles Wathman (BioRad #1703932) en Buffer de Transferencia frío, a saturación. De igual manera equilibrar la membrana previamente activada, en Buffer de Transferencia. Nota: Para la eficiente transferencia de proteína de bajo peso molecular (como LC3), se recomienda eliminar el SDS del buffer de transferencia.
3. Al terminar la electroforesis, retirar el cassette de la cámara electroforética y desmontar el gel del cassette. Remover uno de los vidrios haciendo palanca con una espátula y una vez expuesto el gel, mantenerlo húmedo con Buffer de Transferencia. De lo contrario se secará y correrá el riesgo de sufrir una ruptura.
4. En un contenedor con Buffer de Transferencia, armar un sándwich de la siguiente manera: esponja, 2 papeles Wathman, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, 2 papeles Wathman, esponja. Nota: Después de colocar el primer papel Whatman sobre la membrana, utilizar una espátula y pasarla varias veces sobre el papel Whatman, presionando suavemente a lo largo y ancho del papel para eliminar las burbujas entre el gel y la membrana que pudieran impedir la transferencia de la proteína. Montar el sándwich en el cassette de manera que el gel quede orientado hacia el ánodo y la membrana hacia el cátodo.
5. Llenar la cámara con buffer de transferencia. Normalmente se corre la transferencia 1.5 hrs a 100 V a temperatura ambiente, sin embargo, para proteínas poco abundantes o de bajo peso molecular como LC3 es recomendable transferir toda la noche a 20 V a 4°C. Se sugiere corroborar la calidad de la transferencia de proteínas tiñendo con Rojo de Ponceau 0.1% durante 5 mins. y enjuagar con agua destilada.

Anticuerpo primario	Dilución	Marca	Número de Catálogo	Región de reconocimiento	Anticuerpo Secundario correspondiente
α Atg12	1:1000	Cell Signaling	#4180	Residuos rodeando la Ser36	conejo
α LC3B	1:1000	Abcam	Ab51520	Amino terminal del LC3 isoforma B de	Conejo

				humano	
α Myc-tag	1:1000	Cell Singaling	#2276	Residuos 410-419 del c-Myc de humano	Ratón
α P62	1:1000	Abcam	#56416	Residuos 1-441 de humano	Ratón
α Tubulina	1:500	Cell Signaling	#2125	Amino terminal de proteína α Tubulina humana	Conejo
α Tubulina	1:2000	Cell Signaling	#3873	Residuos alrededor de Val440	Ratón

Tabla 8. Preparación de anticuerpos primarios para ensayos de Western Blotting.

Bloqueo de membrana PVDF e incubación con anticuerpos

1. Se incuba la membrana de PVDF con leche sin grasa al 2% durante 1 hr a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación.
2. Hacer la dilución de los anticuerpos primarios de acuerdo a la Tabla 3. Se diluyen en TBST/2% leche sin grasa o en TBST/3% BSA, de acuerdo a la hoja técnica del mismo. Incubar 1 hr si es policlonal, 2 hr si es monoclonal a temperatura ambiente y en agitación. Si la hoja técnica lo indica incubar el anticuerpo toda la noche (12-14hrs) a 4°C. El anticuerpo primario se reutiliza, almacenar a 4° C. Agregar Azida de Sodio al 0.02% para evitar contaminación.
3. Diluir los anticuerpos secundarios de acuerdo a la Tabla 4. Se diluyen en TBST para quimioluminiscencia o en TBST/3% leche sin grasa (o BSA) para fluorescencia. Incubar entre 30 mins 1hr, de acuerdo a la hoja técnica, a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos utilizados para fluorescencia deben ser protegidos de la luz.

Anticuerpo Secundario	Dilución	Marca	Número de Catálogo
<i>Anticuerpos para revelado mediante quimioluminiscencia</i>			
Anti-conejo	1:10,000	Sigma	A0545

Anti-ratón	1:5,000	Amersham	NA 931
<i>Anticuerpos para revelado mediante fluorescencia</i>			
Anti-conejo IRDye 800	1:15,000	Rockland	611-732-127
Anti-ratón IRDye 700	1:10,000	Rockland	610-732-124

Tabla 9. Anticuerpos Secundarios utilizados en ensayos de Western Blotting.

4. Lavar 3 veces con 5 ml de TBST, en agitación, a temperatura ambiente al finalizar el uso de un anticuerpo para eliminar el anticuerpo sobrante.

Revelado por quimioluminiscencia:

1. En oscuridad, verter revelador, fijador y agua, previamente preparados de acuerdo al fabricante, en charolas para revelar.
2. Incubar la membrana de PVDF 1min con los reactivos de quimioluminiscencia mezclados en proporción 1:1 (ECL western blotting detection reagents and analysis system; Amersham #RPN2106).
3. Eliminar el exceso de ECL con papel Wathman, colocar la membrana de PVDF dentro de un acetato o plástico autoadherente y ubicarla con puntos fluorescentes alrededor.
4. Exponer un film (Kodak, Sigma #Z370398-50EA) durante 1 minuto, inicialmente. El tiempo de las siguientes exposiciones disminuye o aumenta de acuerdo a la intensidad de la señal detectada con la primera exposición.
5. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, sumergir el film secuencialmente en revelador, agua, fijador y nuevamente por agua; 1 min en cada uno.
6. Indicar el peso molecular en el film de acuerdo al marcador de proteínas.

Revelado por fluorescencia:

1. Encender el escáner (Odyssey, LI-COR) e iniciar el programa Odyssey V3.0.
2. Limpiar perfectamente el cristal del escáner, procurando dejar la superficie libre de polvo.
3. Con pinzas o guantes tomar la membrana de PVDF por la orilla y colocarla sobre el cristal, boca abajo. Humedecerla inmediatamente con TBST para evitar que se seque. Colocar la membrana de plástico del Odyssey encima de la membrana de PVDF y con un rodillo

repasar la superficie de la membrana plástica para eliminar cualquier burbuja que pudiera haber entre la membrana de PVDF y el cristal.

4. En el programa Odyssey V3.0, seleccionar el modo membrana y especificar las coordenadas de la misma.
5. Habilitar la casilla que indica el número del fluoróforo al que está acoplado el anticuerpo secundario utilizado.
6. Iniciar el escaneo con intensidad 5, la intensidad de los siguientes escaneos se disminuirá o aumentará de acuerdo a la señal detectada en la primera exposición.
7. Guardar los archivos obtenidos para su posterior análisis y edición.
8. **Análisis densitométrico.** El análisis de las imágenes se lleva a cabo en el programa Odyssey V3.0, utilizando las herramientas de insertar carril e insertar marcadores de banda. Utilizar Tubulina para normalización de datos.

Inmunofluorescencia

DÍA1: Sembrar 2.7×10^4 células/pozo de una laminilla de vidrio de 8 pozos (Lab-tek CC2 #154941) en 100 µl de medio.

DÍA2: Transfectar los plásmidos necesarios.

DÍA3: Aplicar los tratamientos correspondientes y al término de estos llevar a cabo los siguientes pasos:

Nota₁: Todos los pasos a continuación se llevarán a cabo con micropipeta. Es importante que el pipeteo de cualquier solución o medio se lleve a cabo lentamente y colocando la punta de la pipeta en la esquina del pozo y alejado de la base del mismo. Estos cuidados se llevan a cabo con el fin de no desprender y/o aspirar las células de la base del pozo y preservar la morfología celular. ya que un pipeteo brusco puede modificar las prolongaciones celulares.

Nota₂: Es recomendable hacer los lavados pozo por pozo para evitar que las células se deshidraten, lo cual perjudicaría la visualización de las mismas.

1. Retirar el medio
2. Lavar con PBS
3. Agregar PFA 4% e incubar 10 minutos para fijar a las células.
4. Lavar con PBS

5. Permeabilizar con Triton 2%/PBS 1X por 10 minutos
 6. Lavar con PBS
 7. Bloquear 30 minutos con 4% suero de cabra disuelto en 4% de BSA/PBS
 8. Lavar con PBS 3 veces
 9. Agregar anticuerpo primario disuelto en 2% BSA/PBS e incubar 3 horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4°C
 10. Lavar con PBS 3 veces
 11. Agregar anticuerpos secundarios disueltos en 2% BSA/PBS e incubar a temperatura ambiente 1 hora.
 12. Lavar con PBS
 13. Agregar DAPI (D-1306, Invitrogen) de una solución de 5mg/ml emplear dilución 1:500 disuelto en PBS. Dejar actuar 1.5 minutos.
 14. Lavar con PBS
 15. Absorber el PBS y desprender las celdas de plástico, que fungen como separadores de los pozos, de la laminilla de vidrio.
 16. Aplicar una gota 250 µL de medio de montaje especial para fluorescencia (Vector labs, Vectashield h1000) en cada uno de los 8 pozos de la laminilla y colocar el cubre objetos deslizándolo cuidadosamente sobre la laminilla.
 17. Limpiar los residuos de medio de montaje que puedan encontrarse a las orillas de la laminilla y sellar con barniz de uñas transparente todas las orillas.
 18. Almacenar las laminillas en humedad, protegidas de la luz y a 4°C. La fluorescencia puede durar hasta un mes dependiendo de los fluoróforos utilizados.
- A continuación una lista de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo para ensayos de inmunofluorescencia:

Tabla 10. Catálogo de los anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica.

Anticuerpos	Marca	Número de Catálogo	Dilución
<i>Anticuerpos Primarios</i>			
Anti- myc (ratón)	Cell Signaling	#2276	1:500
Anti-LC3 (conejo)	Abcam	#5152	1:1000
<i>Anticuerpos Secundarios</i>			
Alexa Fluor 549 Anti-Ratón	Invitrogen	A-11005	1:1000
Alexa Fluor 488 Anti- Conejo	Invitrogen	A-11034	1:1000

XI. Resultados

La presencia de Gam1 no interfiere con el procesamiento de los complejos tipo ubiquitina de la maquinaria central autofágica

Resultados previos, generados en nuestro laboratorio, mostraron que la expresión de la proteína viral Gam1 redujo la muerte autofágica. Con el afán de elucidar el proceso subyacente, planteamos la posibilidad de que Gam1 pudiera ser capaz de inhibir la maquinaria central de la autofagia y consecuentemente la muerte. Lo anterior basado en las propiedades inhibitorias de Gam1 sobre la SUMOilación que es una conjugación tipo ubiquitinación. Los sistemas que forman parte de la maquinaria central de la autofagia, LC3-II y ATG12-ATG5, presentan un tipo de conjugación similar a ubiquitinación. Por tanto, Gam1 pudiera inhibir la conjugación de LC3B y ATG12 de la misma manera, explicando así los resultados previos.

Estandarización de la transfección de plásmidos utilizando polietilenimina

La mayoría de los experimentos a realizar dependen de una eficiencia de transfección arriba del 80%. Por lo tanto, los primeros experimentos se dedicaron a estandarizar las condiciones óptimas de transfección. Las transfecciones se llevaron a cabo con un polímero lineal formado por cadenas de grupos amino espaciados por dos carbonos (CH_2CH_2) llamado polietilenimina (PEI). Se probaron distintas proporciones de DNA: PEI, 1:2 μg , 1:3 μg y 1:4 μg utilizando un plásmido que expresa la proteína reportera verde fluorescente (GFP) (Fig. 9). La proporción que mostró mayor eficiencia de transfección fue la porción 1:3 μg como se muestra en la Fig. 9 (paneles D, E, F). Partiendo de esta proporción, la duplicamos *i.e.* 2:6 μg y obtuvimos la eficiencia de transfección esperada (paneles J, K, L, Fig. 9).

En los experimentos subsecuentes se utilizaron dos plásmidos, pEGFP-LC3 (proteína verde fluorescente intensificada de eucariontes unida a LC3) y pMyc-Gam1, donaciones de Noboru Mizushima y Susanna Chiocca, respectivamente. Para verificar la identidad de los plásmidos, se llevó a cabo un análisis de restricción para cada uno. En la Fig. 9A observamos el mapa de restricción correspondiente al plásmido EGFP-LC3 que contiene una construcción con EGFP-LC3

bajo el promotor CAG. La restricción Fig. 9B se llevó a cabo tratando con la enzima HindIII o simultáneamente HindIII y XhoI para obtener una banda de 6.2Kb, o bien dos bandas de 1.6Kb y 4.6Kb, respectivamente. Observamos que efectivamente el plásmido genera los fragmentos esperados. En la Fig. 9C se muestra el mapa de restricción correspondiente al plásmido pMyc-Gam1 donde observamos que a la secuencia codificante para Gam1 la precede la etiqueta Myc, ambos se encuentran bajo el promotor SV40. A continuación se realizó la restricción de pMyc-Gam1 (Fig. 9D) utilizando dos enzimas simultáneamente (EcoR1 y HindIII), donde se esperaba obtener dos bandas de 4.1 Kb y 5.3 Kb, tal como se observa en la figura. Con esto corroboramos la identidad de los plásmidos donados.

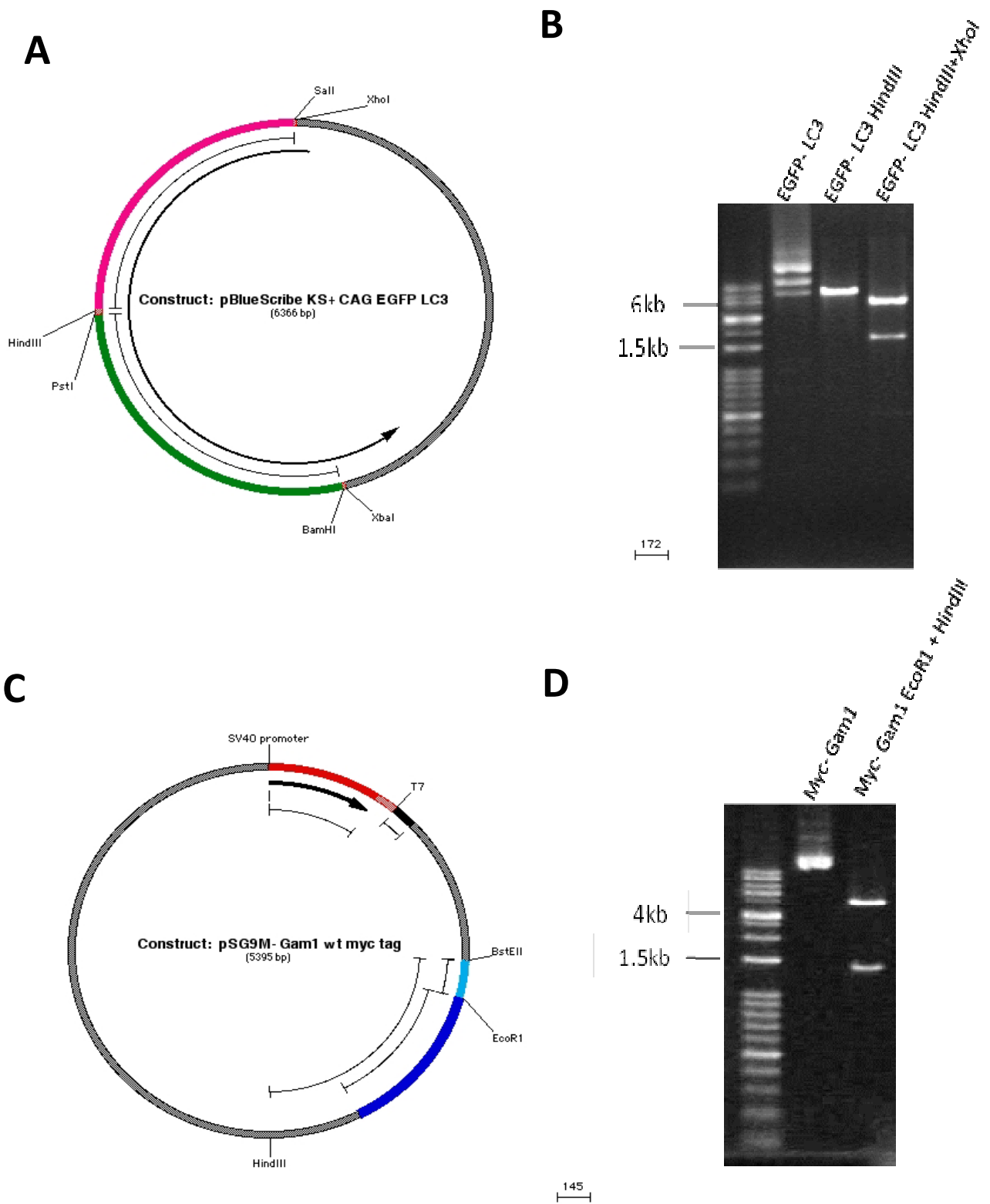


Figura 9. Los plásmidos pEGFP-LC3 y pMyc-Gam1 que recibimos en donación tienen el patrón de restricción esperado. En A) y C) observamos el mapa de restricción correspondiente a los plásmidos pEGFP-LC3 y pMyc-Gam1. En B) y D) se observa la restricción de sendos plásmidos. pEGFP-LC3 con HindIII y EcoR1; pMyc-Gam1 con XhoI y EcoR1.

La presencia de Gam1 no interfiere con la formación del conjugado ATGtg5-ATG12

Evaluamos el efecto de la expresión de Myc-Gam1 sobre la formación del conjugado ATG5-ATG12 durante la autofagia basal e inducida. La aparición del conjugado, tal como se observa en la Fig.10A, se mantuvo en ausencia o presencia de Gam1, ya sea con autofagia basal o inducida por Rapamicina o Trehalosa. Como la Rapamicina está disuelta en DMSO se incluyó este vehículo como control. De igual manera, en el análisis densitométrico, Fig. 10B, la cantidad del conjugado no aumentó o disminuyó de manera apreciable en ninguna de las condiciones. Por tanto, concluimos que Gam1 no afecta la formación del conjugado ATG12-ATG5 de manera detectable evaluado mediante la técnica de Western blot durante la autofagia basal o la inducida durante 4h con Trehalosa o Rapamicina.

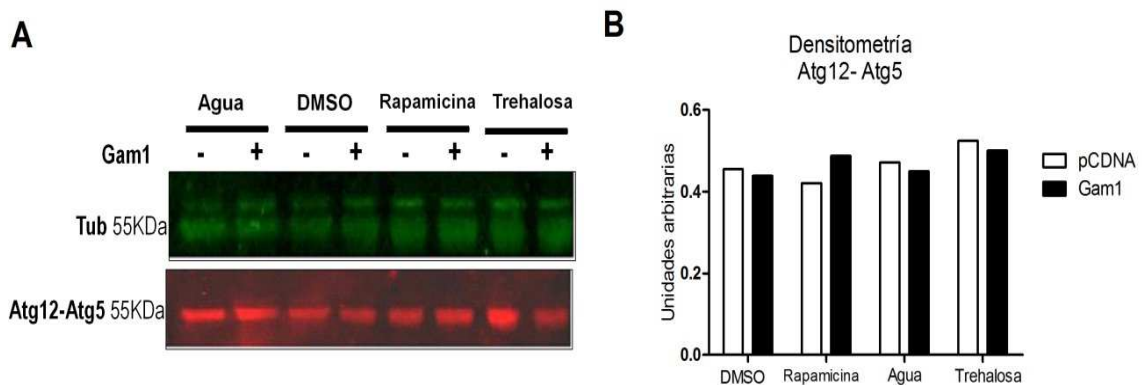


Figura 10. Gam1 no interfiere con el procesamiento del conjugado ATG12-ATG5. Células transfectadas con Gam1 (+) o pCDNA3.1 (-) fueron tratadas con agua, DMSO, Rapamicina o Trehalosa durante 4hrs. En A) se observa un Western blot utilizando anticuerpos contra tubulina y Atg12, que migra alrededor de 55Kda cuando está conjugado a Atg5. En B) se observa la densitometría correspondiente. Se muestra un experimento representativo de n=3 repeticiones.

La presencia de Gam1 no interfiere con el procesamiento de LC3-I en LC3-II

Estudiamos el efecto de Gam1 sobre el procesamiento de LC3-I en LC3-II durante la autofagia basal e inducida. En la Fig. 11A se muestra que la presencia de Gam1 no modificó el procesamiento de LC3-I en LC3-II durante la autofagia basal respecto al control, en el cual se transfectó el vector vacío pCDNA3.1; tampoco se observaron cambios durante la autofagia inducida por Trehalosa. Esto se corroboró en la densitometría correspondiente Fig. 11B. La cloroquina (CQ) es un agente lisosotrópico que traspasa la membrana lisosomal hasta alcanzar el lumen del mismo, donde aumenta su pH de manera que inhibe las proteasas ahí contenidas -estas requieren de pH ácido, para activarse-; inhibe también la formación de los autolisosomas evitando la unión de los autofagosomas con los lisosomas.

Utilizamos este compuesto para evitar la degradación de LC3-II dentro del autolisosoma, permitiendo su acumulación y de esta manera evaluar el efecto de Gam1 sobre la capacidad de producción neta de esta proteína durante la autofagia. Observamos que no hubo cambio alguno sobre la cantidad total de proteína LC3-II en presencia de Gam1 en los conjugados que se observan durante la autofagia. Con estos resultados concluimos que Gam1 no tiene un efecto inhibitorio o inductor, notable mediante Western Blot, sobre la formación de LC3-II durante la autofagia basal o inducida por trehalosa durante 4hrs.

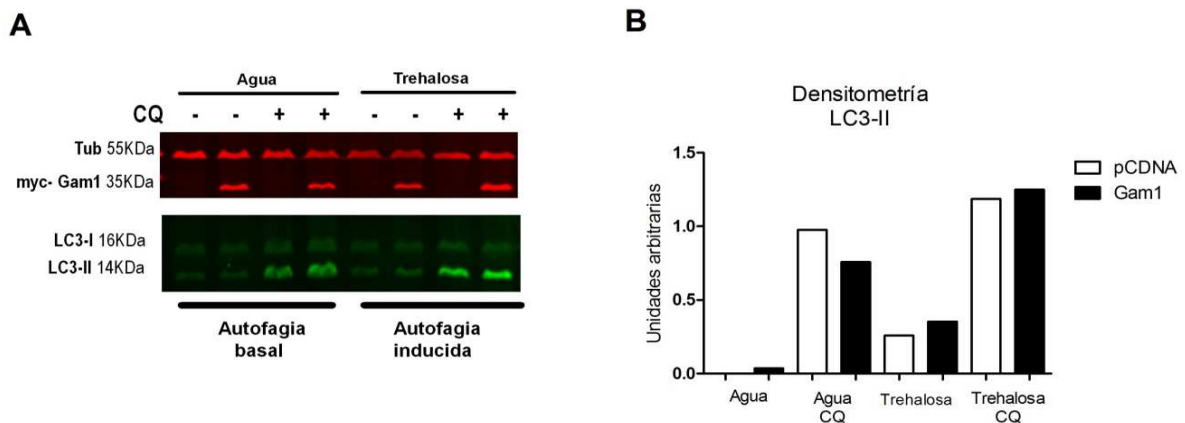


Figura 11. Gam1 no interfiere con el procesamiento de LC3-II. En A) se muestra un Western blot para detectar a LC3 en proteína extraída de células transfectadas con Gam1 o pCDNA3.1 y tratadas con los compuestos indicados. Trehalosa durante 4hrs; Cloroquina (CQ) durante 5 hrs. Se detectó tubulina como referencia de carga y se verificó la expresión de Gam1 al detectar el epítipo Myc. En B) se presenta la densitometría correspondiente a las bandas de LC3-II respecto a tubulina para los diferentes tratamientos. Este es un experimento representativo de tres repeticiones.

Gam1 no interfiere con la formación de autofagosomas

Gam1 parece no afectar el procesamiento de la proteína LC3 durante la autofagia, basal o inducida. Sin embargo, cabe la posibilidad de que lejos de modificar su procesamiento, modifique la distribución de esta proteína en citoplasma. En células transfectadas con la construcción GFP-LC3 en condiciones basales, la proteína se observa difundida en citoplasma; no así durante la autofagia inducida donde se aprecia en patrones punteados. Estas formaciones reflejan el reclutamiento de GFP-LC3 en las membranas autofagosomales desde donde logra una señal fluorescente focalizada y de mayor intensidad que, vista al microscopio, da lugar a puntos definidos¹⁹. Para este estudio tomamos en cuenta únicamente aquellas células que expresan GFP-LC3 y que colocalizaban con la expresión de Gam1, como se muestra en los paneles de la tercera columna de las Fig. 12 y 13. En los tratamientos control (Fig. 12), LC3 presentó un patrón difuso típico de la autofagia basal. Este patrón se observó tanto en las células expresando el vector vacío como Gam1 (Fig. 12 A, a; D, d). Agregamos Cloroquina (CQ) para detener el flujo de la autofagia y visualizar fácilmente los autofagosomas. Vistos al microscopio, se detectan patrones punteados cuyas unidades fueron de mayor diámetro, abundancia e intensidad fluorescente que los patrones de aquellas células carentes de cloroquina (Fig. 12 G, g; J, j). Estos resultados muestran que no hay diferencias observables entre los patrones punteados formados por células expresando Gam1 o pCDNA3.1 durante la autofagia basal.

A continuación se evaluó la formación neta de autofagosomas durante la autofagia basal e inducida, agregando cloroquina (Fig. 13). Se observaron patrones punteados característicos de autofagosomas tanto en células con el vector vacío como expresando Gam1. Sin embargo, aquellas que expresan Gam1 presentaron un patrón punteado más denso (Fig 13. a, d, f, j). Al agregar cloroquina, los puntos observados eran de mayor tamaño respecto a aquellas sin CQ (Fig. 12). La presencia de Gam1 parece no tener efecto alguno sobre la producción neta de autofagosomas (Fig 13).

Finalmente, se hizo una cuantificación de los fenotipos celulares de acuerdo al arreglo de LC3 en citoplasma, difuso o punteado, para cada tratamiento (Fig. 14 A, B). Encontramos que las células tratadas con Trehalosa presentan una mayor cantidad de LC3 punteado respecto a las células control; estos resultados sugirieron que efectivamente la presencia de Gam1 no modificó la frecuencia de aparición de los patrones punteados al ser comparados con las condiciones control. En conjunto los resultados indican que Gam1 no interfiere con el proceso de formación de

autofagosomas directamente, apoyando el papel de la SUMOilación en la muerte celular autofágica.

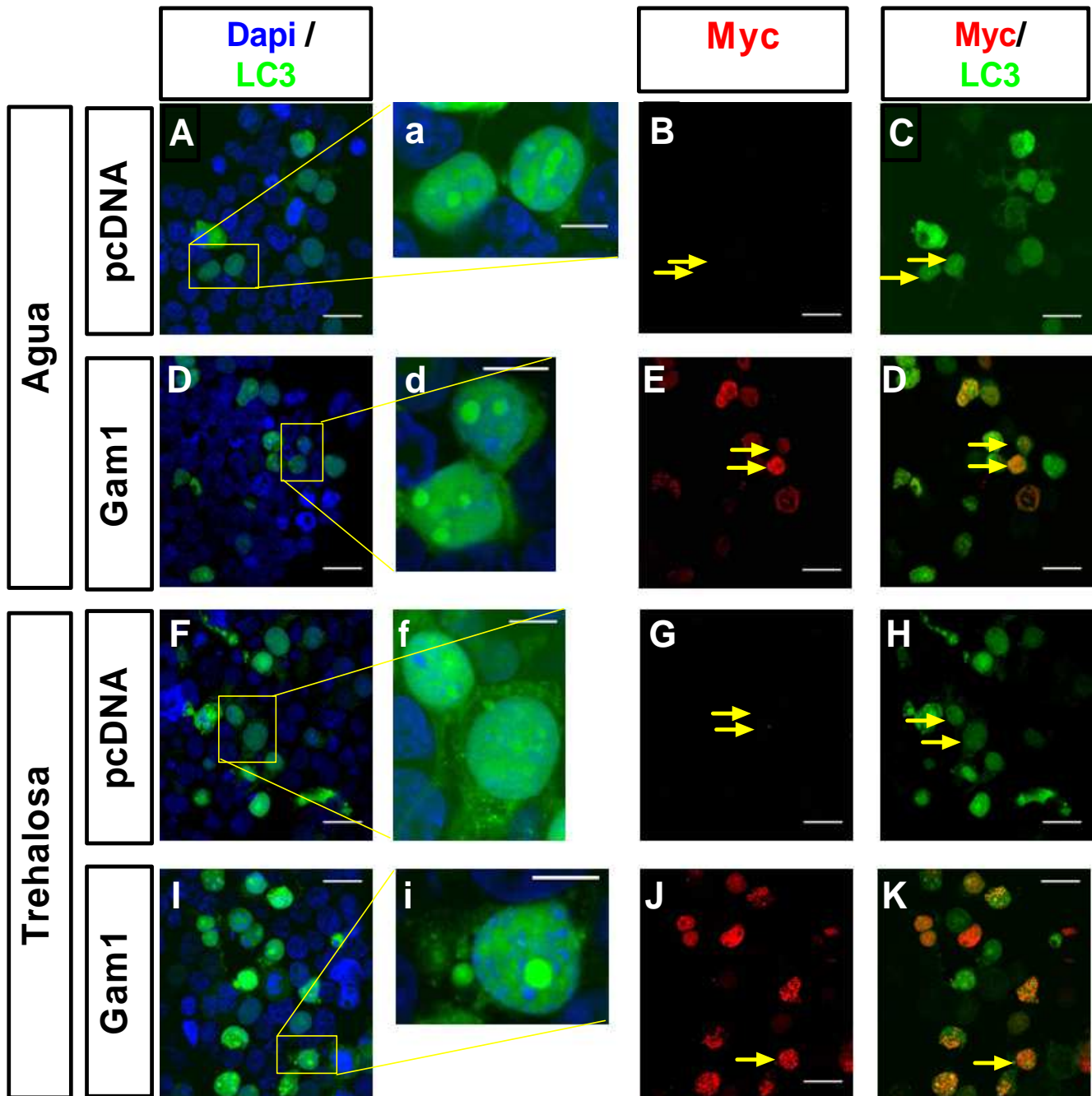


Figura 12. Gam1 no afecta la formación de autofagosomas en la autofagia inducida por trehalosa. Imágenes de microscopía de fluorescencia en células transfectadas con EGFP-LC3 y myc-Gam1, posteriormente tratadas con trehalosa o agua por 4 hr. La expresión de Gam1 se verificó por inmunofluorescencia utilizando anti-Myc revelado en rojo y la distribución de LC3 observando la localización de EGFP, ya que están fusionadas. Se observaron los núcleos con DAPI. En a, d, g, j se observan las ampliaciones de los recuadros indicados. Las flechas indican que las células amplificadas expresaron Gam1. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. La barra de escala para las imágenes panorámicas es de 30 μ m; la barra de escala para las ampliaciones es de 10 μ m.

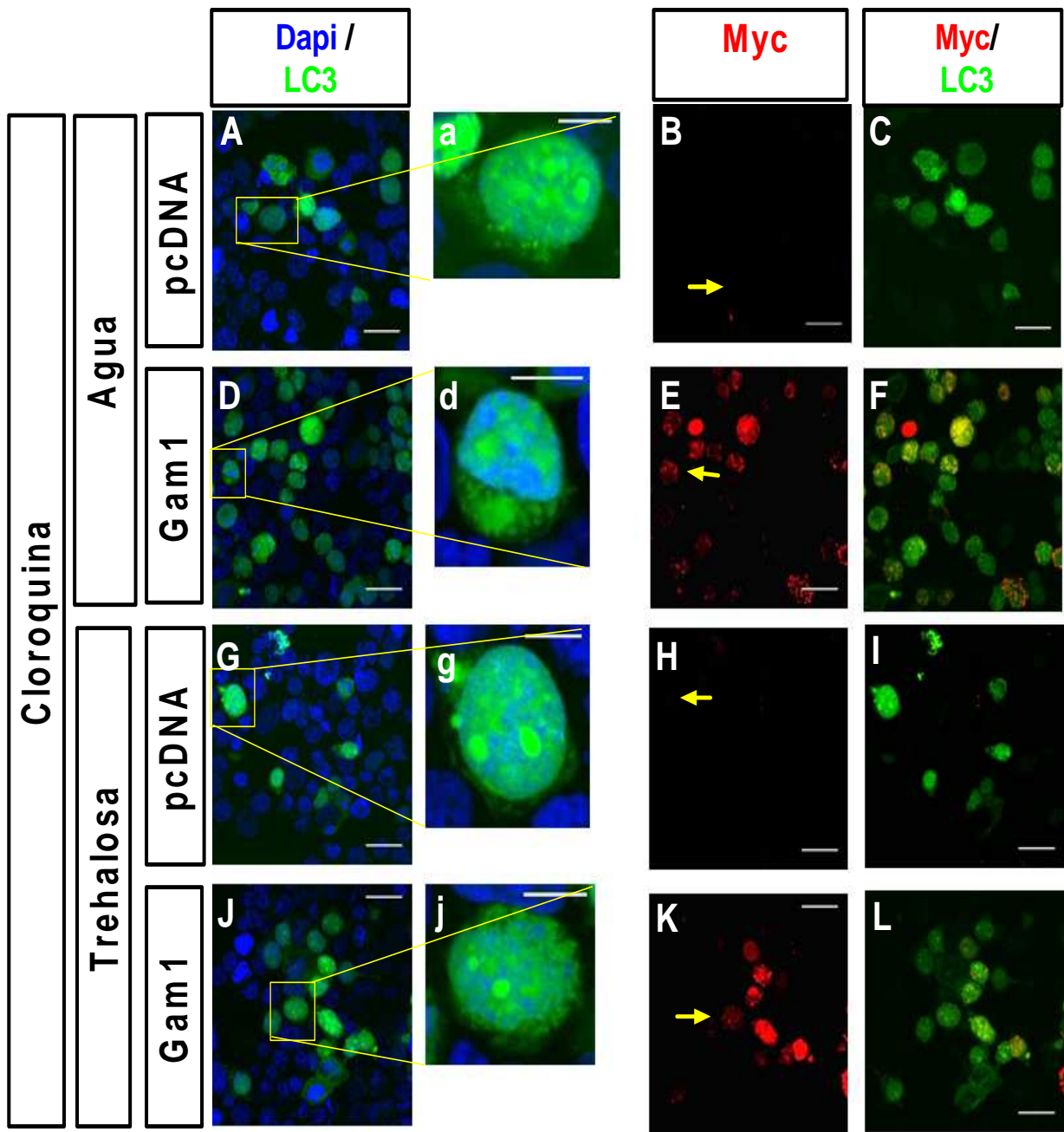
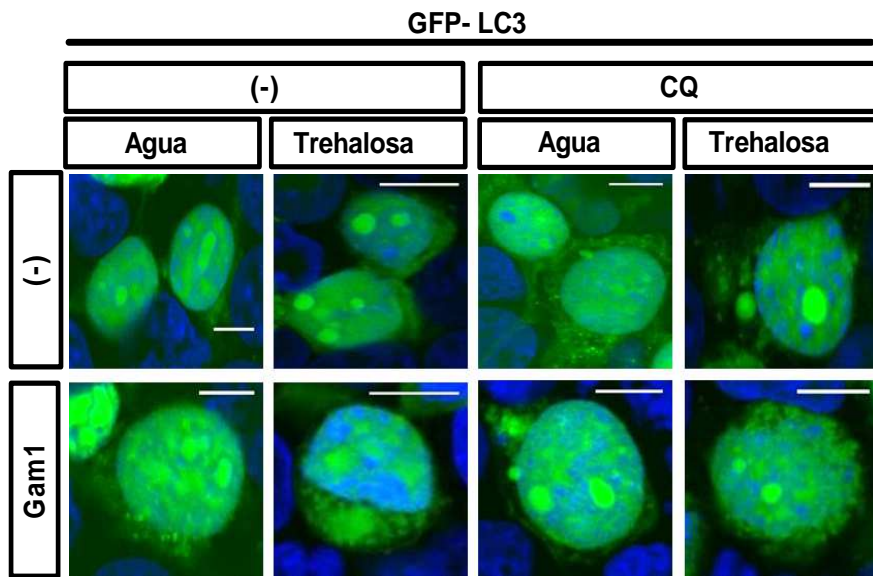


Figura 13. Gam1 no interfiere con la formación neta de autofagosomas en la autofagia inducida por trehalosa y truncada por cloroquina. Imágenes de microscopía de fluorescencia en células transfectadas con GFP-LC3 y myc-Gam1 y posteriormente tratadas con cloroquina por 5 hr y agua o agua por 4 hr. La expresión de Gam1 se verificó por inmunofluorescencia utilizando anti-Myc revelado en rojo y la distribución de LC3 observando la localización de EGFP, ya que están fusioandas. Se observaron los núcleos con DAPI. Imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia. En A, D, G, J se observan los núcleos (DAPI) sobrelapados con el canal verde (LC3). En a, d, g, j se observan los zooms de los recuadros indicados. En B, E, H, K, se observa Gam1 (rojo). En C, F, I, L, se observa el sobrelape de los canales verde(LC3) y rojo (myc). Imágenes representativas de n=3 experimentos independientes. La barra de escala para las imágenes panorámicas es de 30 μ M; la barra de escala para los zooms es de 10 μ M.

A



B

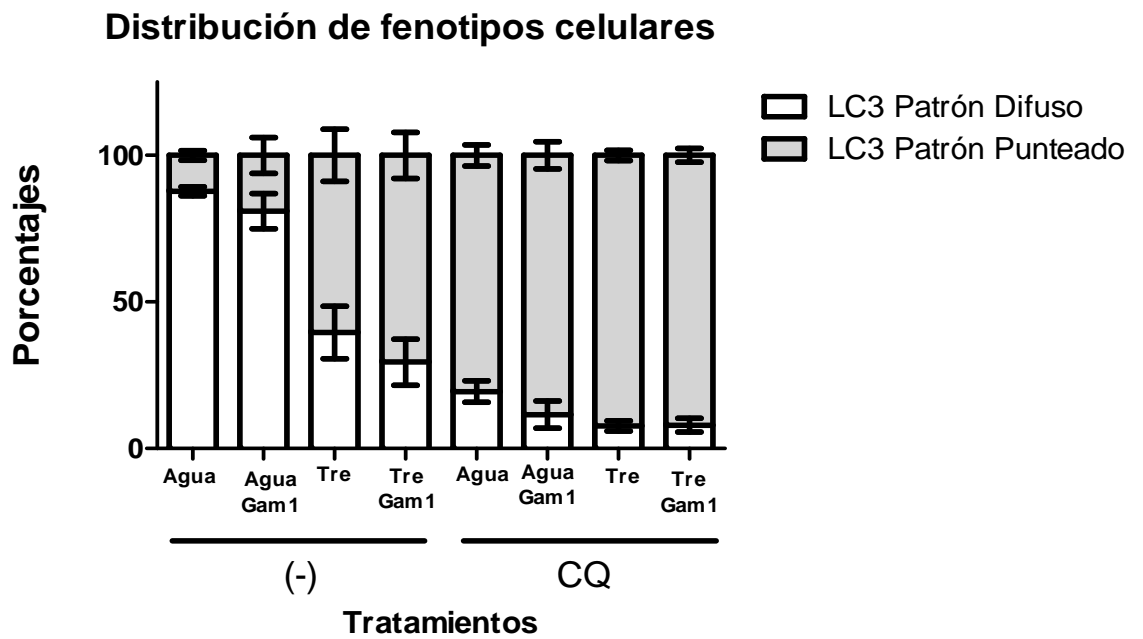


Figura 14. La presencia de Gam1 no interfiere con la distribución de los fenotipos celulares (difuso/punteado) durante la autofagia. Representación en porcentajes de conteos celulares de fenotipos difuso y punteado donde una célula que con 5 puntos o más se contaba como patrón punteado. Una célula con menos de 5 puntos se tomaba como una célula correspondiente a patrón difuso. Se contaron >100 células por tratamiento por experimento. Los experimentos fueron n=3, independientes. La barra de escala mide 10µM.

Gam1 no interfiere con el flujo de la autofagia

Si bien observamos que Gam1 no interfiere con ninguno de los conjugados involucrados en etapas iniciales de la autofagia, ni con la formación de autofagosomas, estos resultados entonces apuntan a que la inhibición de la muerte celular autofágica observada en presencia de Gam1 pudiera estar ocurriendo debido a su impacto inhibitorio en etapas avanzadas del flujo de la autofagia. Para corroborar esta idea medimos la abundancia de p62, una proteína que reconoce y se une tanto a LC3 como a agregados proteicos ubiquitinados para ser degradados por autofagia. p62 es considerado un marcador fiel de las últimas etapas del flujo de la autofagia pues se mantiene unido a los agregados proteicos hasta que estos son degradados. De ahí que la disminución de esta proteína indica un aumento en la tasa de degradación de proteínas, evento que correlaciona con un aumento en la autofagia; y viceversa, su acumulación correlaciona con una disminución en la tasa de degradación o inhibición del flujo de autofagia⁶⁰. En la Fig. 15A y B observamos que los tratamientos inductores de autofagia, Rapamicina y Trehalosa, presentan una disminución en la cantidad de p62 como es esperado, al ser comparados con sus respectivos vehículos, DMSO o agua. Ahora bien, en las células transfectadas con Gam1 no se observó un aumento o disminución de p62 respecto a las células que expresan el vector vacío para ambos tipos de autofagia. Dado que Gam1 no alteró la abundancia de p62 de manera significativa, podemos concluir que no afecta los pasos finales del flujo de la autofagia. Esto nos lleva a apoyar la interpretación de que la inhibición de la muerte autofágica observada al expresar Gam1 se debe a su actividad como inhibidor de la SUMOilación y no a una interacción directa con la maquinaria autofágica.

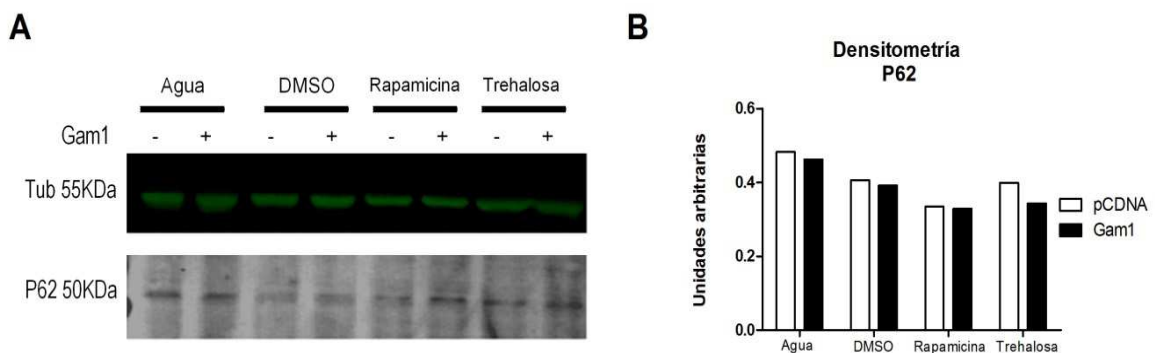


Figura 15. La presencia de Gam1 no interfiere con el flujo de la autofagia. En A observamos la proteína p62 extraída de células transfectadas con Gam1 o pcDNA y reveladas por Wester Blotting a las que se les indujo la autofagia mediante Rapamicina o Trehalosa durante 4hrs. En B observamos la densitometría correspondiente.

Las secuencias aminoacídicas de las proteínas LC3, ATG12 y ATG5 carecen de sitios consenso para la SUMOilación

Los resultados en las secciones anteriores indican que Gam1 no interfiere con el proceso de conjugación de lipídación de LC3 o de conjugación de ATG12 con ATG5, por lo que, esto nos llevó a explorar que la inhibición de la muerte autofágica podría estar asociada con la inhibición de la maquinaria de SUMOilación directamente. Si bien la hipótesis original es que proteínas como NR4A1 son los blancos de SUMOilación, podría ser que estos conjugados de la maquinaria central de la autofagia sean modificados por SUMOilación. Si ese fuera el caso, la presencia de Gam1 afectaría su actividad y por tanto afectaría la maquinaria autofágica explicando la inhibición de la muerte. Se analizaron las secuencias proteicas de LC3, ATG12 y ATG5 en busca de sitios consenso para la SUMOilación (Ψ KXE). Para ello se localizaron cada una de las lisinas (K) y se buscó similitud con el motivo para la SUMOilación; sin embargo, no se encontró tal motivo en ninguna de ellas como se muestran en la Fig. 16. Acorde con esto, las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnología (NCBI) y la Fuente Universal de Recursos Proteicos (UniProt) no poseen información alguna acerca de la SUMOilación de sendas proteínas. Al momento los resultados sugieren que la razón por la cual Gam1 interfiere con la muerte celular no tiene que ver con fallas inducidas en la maquinaria central de la autofagia, apuntando a que probablemente sean sus efectos sobre la SUMOilación de otras proteínas lo que afecta de manera determinante la muerte.

A
MAEEPQSVLQ LPTSIAAGGE GLTDVSPETT TPEPPSSAAV SPGTEEPAGD TKKKIDILLK
AVGDTPIPKT KKWAVERTRT IQGLIDFIKK FLKLVASEQL FIYVNSFAP SPDQEVGTLY
ECFGSDGKLV LHYCKSQAWG

B
MPSEKTFKQR RTFEQRVEDV RLIREQHPTK IPVIERKYG EKQLPVLDTK KFLVPDHVNM
SELIKIIRRR LQLNANQAFF LLVNGHSMVS VSTPISEVYE SEKDEDGFLY MVIASQETFG
MKLSV

C
MTDDKDVLDRD VWFGRIPTCF TLYQDEITER EAEPYLLLP RVSYLTLVTD KVKKHFQKVM
RQEDISEIWF EYEGTPLKWH YPIGLLFDLL ASSSALPWNI TVHFKSFPEK DLLHCPSKDA
IEAHFMSCMK EADALKHKSQ VINEMQKDH KQLWMGLQND RFDQFWAINR KLMEYPAEEN
GFRYIPFRIY QTTERPFIQ KLFRPVAADG QLHTLGDLLK EVCPSAIDPE DGEKKNQVMI
HGIEPMLETP LQWLSEHLSY PDNFLHISII PQPTD

Figura 16. SecuenciaS aminoacídicas correspondiente a las proteínas A) ATG12, B) MAP1_LC3B y C) ATG5 de *Homo Sapiens* no posee sitios consenso para la SUMOilación (Uniprot, 2014; <http://www.uniprot.org/>), No. de secuencias :O94817; Q9GZQ8; A9UGY9 .

La SUMOilación del receptor NR4A1 es necesaria para que ejecute su función durante la muerte autofágica inducida por SP/NK₁R

En vista de que Gam1 no tuvo efecto sobre los conjugados de la maquinaria central de la autofagia, y que previamente se había observado que Gam1 inhibe la SUMOilación de NR4A1, exploramos la hipótesis de que este receptor requiere de su SUMOilación para conducir a la muerte autofágica activada por SP/NK₁R. Para abordar esta pregunta estudiamos la función de una mutante no SUMOilable de NR4A1, en la cual tres lisinas que se encuentran en sitios consenso para la SUMOilación fueron remplazadas por argininas. Para estudiar el fenotipo de la mutante fue necesario inhibir la expresión de NR4A1 endógeno, pues su expresión se induce en respuesta a SP y podría enmascarar el fenotipo de la mutante. Se diseñó una mezcla de RNAs de interferencia (siRNA) para silenciar específicamente al receptor endógeno o silvestre y así evaluar el efecto provocado únicamente de la mutante.

Los interferentes pequeños de RNA (siRNA) contra la región 3' no traducida de NR4A1 funcionan para silenciar específicamente la expresión endógena de NR4A1.

El cDNA de NR4A1 está clonado en el vector de expresión pcDNA3.1, en el cual se **mutaron** tres lisinas en sitios consenso de SUMOilación, y contiene exclusivamente el marco abierto de lectura (es decir, del condón de inicio al condón de paro) y carece de las secuencias 5' y 3' no traducidas del mRNA de NR4A1. Por lo tanto, se espera que siRNAs dirigidos a las secuencias no traducidas silenciarán exclusivamente al mRNA endógeno. Se diseñaron cuatro siRNA dirigidos a la región 3' no traducida (a estos siRNAs los llamamos siUTR3') del receptor NR4A1 como se observa en la Fig. 17, las lisinas sustituidas por argininas se encuentran en las posiciones K102, K577 y K558 (mutante realizada por Gabriela Zárraga, 2011); nos referiremos de aquí en adelante a esta mutante triple como mutNR4A1 y a la construcción del cDNA silvestre que transfectamos como NR4A1 exógeno o NR4A1ex. Para validar la funcionalidad de la interferencia de RNA se utilizaron también siRNAs dirigidos al marco abierto de lectura, cuya efectividad ya se había probado. Estos

siRNAs (a los que llamamos siCod) inhiben la expresión tanto del mRNA endógeno como del transfectado o exógeno (ya sea mutante o silvestre).

```

Sec_1 318 ----- agatgccctgtatccaagcccaatatgggac 348
Sec_2 899 GCGTTTAAACGGGCCCTCtagacggccgg agATGCCCTGTATCCAAGCCCAATATGGGAC 958
Sec_1 349 accagcaccgagtc cgggaccccgtagaccacctggcaagcgacccctgacccctgagtt 408
Sec_2 959 ACCAGCACCGAGTC CGGGACCCCGTAGACCACCTGGCAAGCGACCCCTGACCCCTGAGTT 1018
Sec_1 589 gtccctcagccacctccctgcctctgctcctt caagttcgaggacttccaggtgtacgg 648
Sec_2 1199 GTCCTCAGCCACCTCCCCTGCC TCTGCCTCCTTC AGATTTCGAGGACTTCCAGGTGTACGG 1258
Sec_1 889 ttccttcagtcctcccaccggccccagccccagcctggccccagagccccctg aagttggt 948
Sec_2 1499 TTCCTTCAGTCCTCCACCGGCCAGCCCCAGCCTGGCCAGAGCCCCCTG AAGTTGTT 1558
Sec_1 949 ccctcacaggcca cccaccagctggggagggagagagctattccatgctacggcctt 1008
Sec_2 1559 CCCCTCACAGGCA CCCACCAGCTGGGGAGGGAGAGAGCTATTCCATGCCTACGGCCTT 1618
Sec_1 1189 cttcaagcgcacagtcagaaaaacgccaagtacatctgcctggct aacaaggactgccc 1248
Sec_2 1799 CTTCAAGcgcacagtcagaaaaacgccaagtacatctgcctggct aacaaggactgccc 1858
Sec_1 1969 ctgctgtcacgtctgttggg caaactgcccagctgcccaccctgtgcaccaggccct 2028
Sec_2 2579 ctgctgtcacgtctgttgggc agactgcccagctgcccaccctgtgcaccaggccct 2638
Sec_1 2029 gcagcgcattctctacct caagctggaggacttgggtccccctccaaccatcattgacaa 2088
Sec_2 2639 gcagcgcattctctacctc acgttggaggacttgggtccccctccaaccatcattgacaa 2698
Sec_1 2089 gatcttcatggacacgctgcccttc tga----- 2116
Sec_2 2699 gatcttcatggacacgctgcccttc tgagAATTCACCACACTGGACTAGTGGATCCGAG 2758
Sec_1 2365 aaccggttttaaacacata gcgccgtgctgtaaataagcccagtgctgctgtaaaataca gg 2424
Sec_2 6835 GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCAT CATTGGAAAACGTTCTTC GGGGCGAAAA 6894
Sec_1 2485 cagcctttccagcctcctgctggctctctcttccctaccctcctt ccacatgtacataaac 2544
Sec_2 6955 TGATCTTCAGCATCTTTACTTTACACAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAA 7014
Sec_1 2545 tgtcactctagg aagaagacaaatgacagattctgacatttatatttgtgtattttcctg 2604
Sec_2 7015 AATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTT 7074

```

[Sec_1], [Sec_2]:	[Sec_1]:	[Sec_2]:
Codón de Inicio	siRNA 3'UTR #89	K102R
NR4A1	siRNA 3'UTR #91	K577R
K102	siRNA 3'UTR #87	K558R
K577	siRNA 3'UTR #93	
K558		
siRNA Cod_A		
siRNA Cod_B		
siRNA Cod_C		
Codón de Paro		

Figura 17. Alineamiento de la secuencia_1 NR4A1 endógeno respecto mutNR4A1-K102R,K558R,K577R. Observamos el codón de inicio (azul), la secuencia codificante para el receptor NR4A1 (naranja), los codones coficientes para las lisinas parte de los sitios consenso para la SUMOilación(morado) ,los sitios blanco de los siRNAs contra la región UTR3'(rosa), las secuencias de los siRNAs contra la región codificante (verde) y el codón de paro (rojo). Los guiones (-) entre secuencias indican correspondencia entre secuencias, los espacios indican falta de correspondencia.

Primero se demostró que los siRNAs silenciaran la expresión de NR4A1 endógeno, cuyo pico de expresión ocurre a las 3h de exposición a SP. Se co-transfectó el vector de expresión del receptor de SP NK₁R con cantidades variables de siRNAs, ya sea siUTR3', siCod, o siRNAs irrelevantes porque son dirigidos contra secuencias que no existen en el genoma humano (siIrr). En la Fig. 18A se encontró que el silenciamiento de NR4A1 se logró a partir de los 50 pmoles de siRNA; sin embargo, la cantidad óptima es la concentración 100 pmol, por lo que fue la utilizada en las transfecciones subsiguientes. La efectividad del silenciamiento con siUTR3' es comparable con la alcanzada por el siRNA contra la región codificante del receptor NR4A1 (siCod). El siguiente paso consistió en mostrar que los siUTR3' permiten la expresión de NR4A1 exógeno (NR4A1ex). Para ello se co-transfectó el plásmido pcDNA3.1_NR4A1 con los diferentes siRNAs, o bien con el vector vacío como control. Como se observa en la Fig. 19B, tanto siCod como siUTR3' inhibieron la expresión de NR4A1 endógeno, mientras que sólo los siCod inhibieron la expresión de NR4A1ex. Aunque los siUTR3' disminuyeron moderadamente la expresión de NR4Aex, funcionan para probar los efectos de NR4A1ex, sin que la actividad del endógeno influya en el fenotipo estudiado.

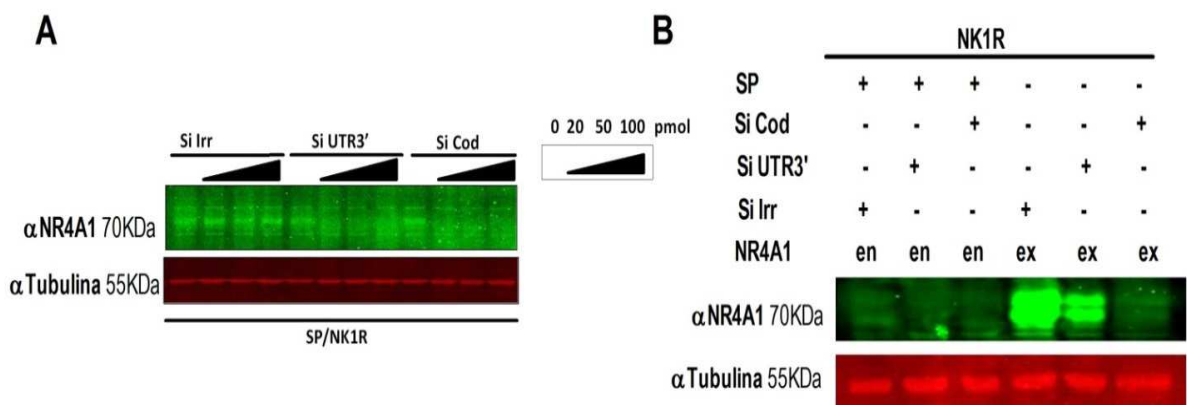


Figura 18. Los siRNA UTR3' silencian efectivamente el receptor NR4A1 endógeno (en) más no el exógeno (ex). En A) se observa un Western blot contra NR4A1 y tubulina de células HEK293T transfectadas con NK₁R y los siRNAs indicados: Irrelevante (Si Irr), Si UTR3', codificante (siCod) en las concentraciones (pmol) indicadas. Se trataron con SP (100nM/3hrs). En B) se observa un Western blot contra NR4A1 y tubulina de células HEK293 transfectadas con NR4A1ex (ex) o con pcDNA (en) y con los siRNAs indicados.

La mutante triple en sitios de SUMOilación de NR4A1 es incapaz de matar durante la muerte autofágica inducida por SP/NK₁R

Una vez constatada la funcionalidad de los siUTR3', diseñamos un experimento para evaluar la capacidad de NR4A1mut para inducir la muerte esperada por SP/NK₁R. Para ello reemplazamos la expresión de NR4A1 endógena transfectando los siUTR3' por la expresión de NR4A1mut o NR4A1 silvestre como control. Si la SUMOilación de NR4A1 es necesaria para inducir la muerte autofágica esperamos observar que la mutante sea incapaz inducir la muerte en comparación con la silvestre. Transfectamos los siRNAs previamente probados junto con la mutante NR4A1mut o bien junto con NR4A1 silvestre permitiéndonos con ello evaluar las consecuencias celulares de expresar un NR4A1 incapaz de SUMOilarse, sin contaminación del endógeno. En la Fig.19A se muestra la eficiencia del silenciamiento de NR4A1 endógeno, permitiendo la expresión de NR4A1 silvestre (NR4A1ex) o NR4A1mut. La expresión de NR4A1 endógena (transfectando el vector vacío pCDNA) que se induce por SP no se afectó en presencia del siRNA control (silrre). Como era esperado, la expresión de NR4A1 endógeno disminuyó considerablemente en presencia de los siUTR3' bajo la inducción con SP, sin afectar notoriamente la expresión de NR4A1ex o NR4A1mut. En la Fig. 19B se muestra la cuantificación de la viabilidad celular determinada por exclusión de azul de tripano. Se puede observar que la expresión de NR4A1 silvestre (NR4A1ex) produjo un porcentaje de muerte similar al que se observa con NR4A1 endógeno (pCDNA), mientras que la expresión de la mutante no SUMOilable NR4A1 mut perdió esta función.

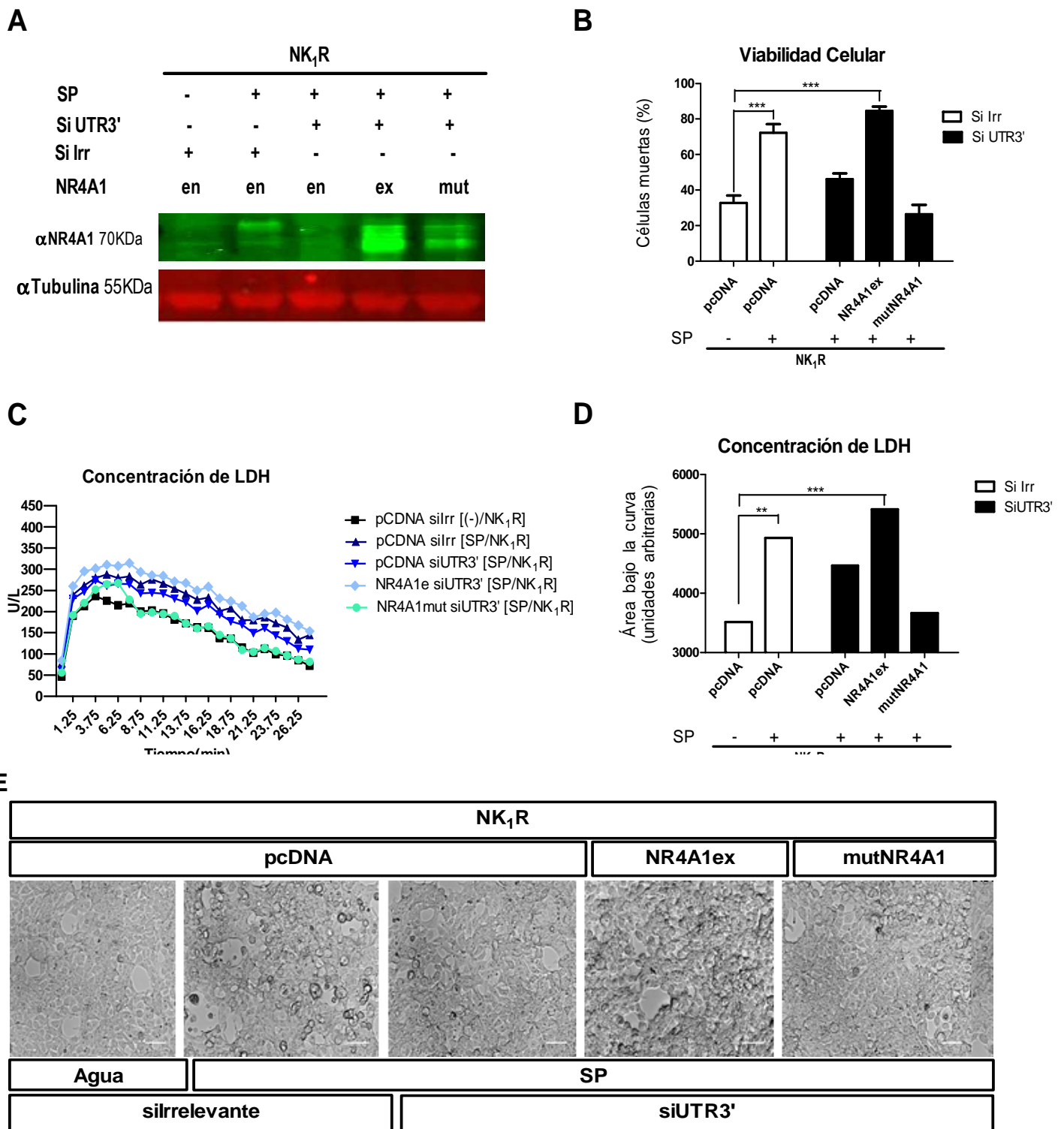


Figura 19. La mutNR4A1 es incapaz de inducir la muerte. Se transfectaron células con NK₁R, los siRNA interferentes indicados y NR4A1 exógeno (NR4A1e), la mutante triple (NR4A1mut) o pCDNA. En a) Western blot contra NR4A1 y tubulina de células tratadas con SP por 3hrs. b) cuantificación de la viabilidad celular, por exclusión de azul de tripano, de células tratadas con SP por 48 hr; representado en porcentajes; un histograma del promedio de n=3 experimentos independientes, las barras corresponden al error estándar. c) Curva de concentración de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) tratadas o no con SP por 48 hr, transfectadas con los plásmidos y siRNAs indicados. d) Área bajo la curva de la gráfica en c. e) Microscopía de campo claro de células transfectadas con los plásmidos y siRNAs indicados tras 27 hr de tratamiento con SP o agua; imágenes representativas de n=3 experimentos independientes. Barra de escala equivale a 50 μ m.

Se corroboró la pérdida de función para inducir muerte celular autofágica de NR4A1mut cuantificando viabilidad celular por liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). En la Fig. 19C se muestra la concentración de la enzima LDH en el sobrenadante y en la Fig. 19D se muestra un histograma del área bajo las curvas de LDH. Observamos que la expresión de NR4A1 exógeno con SP causó una liberación de LDH un poco mayor que NR4A1 endógeno. NR4A1mut causó una liberación limitada de LDH, comparable al control en ausencia de SP. El silenciamiento de NR4A1 endógeno con siUTR3' en estos experimentos redujo parcialmente la liberación de LDH. En la figura 19D se muestra la morfología de las células en las diferentes condiciones, haciendo notorio el rescate de la muerte celular al silenciar la expresión de NR4A1 con siUTR3', que se recupera al expresar NR4A1 silvestre, lo cual no sucede con la expresión de NR4A1mut. De esta figura concluimos que la mutante triple en sitios de SUMOilación de NR4A1 es incapaz mediar la muerte celular autofágica inducida por SP/NK₁R.

XII. Discusión

En este trabajo estudiamos el mecanismo por el cual la proteína viral GAM1 evita la muerte celular autofágica, utilizando como modelo la muerte inducida por la activación del receptor NK₁R por su ligando, la Sustancia P. Considerando las semejanzas bioquímicas entre los procesos de SUMOilación con la conjugación de LC3-PE y ATG5-ATG12, evaluamos primero si GAM interfiere directamente con la maquinaria central de la autofagia, este objetivo se evaluó en la autofagia basal y en la inducida.

Encontramos que la autofagia (basal o inducida) parece no ser afectada por la presencia de GAM1. Una vez transfectado el gen, la proteína GAM1 comienza a detectarse a partir de las 5 h. Nosotros medimos los efectos sobre el procesamiento de LC3-II y de ATG5-ATG12 durante la autofagia 24hrs después de transfectadas las células, por lo tanto analizamos posibles cambios en su procesamiento desde que *Gam1* fue expresado en la célula, o sea probablemente alrededor de 12 horas desde su producción. Considerando que el recambio de LC3-II y de ATG5-ATG12 pudiera ser más lento que la ventana de tiempo en que analizamos, se buscó inducir la formación de estos conjugados al inducir la autofagia con trehalosa. En este caso la presencia de GAM1 tampoco interfirió con la abundancia de LC3-II o de ATG5-ATG12. De ahí concluimos que el efecto de GAM1 sobre el procesamiento de los conjugados tipo ubiquitina de la maquinaria central de la autofagia es prácticamente nulo.

Entre los tratamientos que utilizamos como inductores de autofagia asociados a la sobrevivencia, trehalosa mostró ser un mayor inductor de autofagia que la rapamicina durante cuatro horas de tratamiento en células HEK293T. Este fenómeno puede ser explicado por dos razones. Una de ellas, la rapamicina esta disuelta en DMSO que es un solvente conocido por ser un factor dañino para la célula e incluso es capaz de inducir autofagia por sí mismo. Como comparamos la respuesta de rapamicina respecto a DMSO, el efecto de DMSO *per se* pudo enmascarar el resultado dando la apariencia de no inducir suficiente autofagia respecto a su control. Otra posible explicación es que, ahora se sabe ¹⁹ que la Rapamicina aunque funciona muy bien en levaduras, no es el inductor de autofagia más efectivo ya que no se une de manera eficiente al dominio cinasa de mTOR;

actualmente se recomiendan la utilización de péptidos que se pegan de manera específica a esta subunidad induciendo de manera eficaz la autofagia.

Ahora bien, la trehalosa, un azúcar utilizado recientemente para el estudio de la autofagia, cuya forma de actuar en la célula no es del todo conocida, ha mostrado ser efectiva ya que con tan solo 4hrs de exposición en los cultivos celulares se logran niveles de inducción de marcadores de autofagia detectables por encima de la autofagia basal. Sin embargo, los niveles de inducción utilizados en este trabajo no son tan altos bajo las 4hrs recomendadas en diversas publicaciones²⁰. Por lo que en futuras aplicaciones se recomendaría inducir autofagia durante más tiempo. Ahora bien, otra pregunta interesante que sigue sin ser contestada es ¿qué es lo que hace que la trehalosa sea un inductor de autofagia? Podría tener relación con el hecho de que, al ser un azúcar desconocido para las células mamíferas, probablemente no pueda utilizarlo al igual que la glucosa, haciendo que ésta reaccione a su abundancia en el entorno como un tipo alerta. Ejemplos conocidos de estados de alerta dados por concentración de alguna molécula se encuentran el AMP en razón de ATP, donde la abundancia de AMP corresponde a una baja energética de la célula y viceversa. También es el caso para la razón lactosa/glucosa en donde la abundancia de lactosa es un indicador que lleva a la hidrólisis para aumentar la concentración de glucosa. Esto es tan sólo una especulación, habría que hacer la comprobación experimental.

En cuanto a la formación de autofagosomas detectados por la presencia de la construcción GFP-LC3, observamos que la presencia de GAM1 no induce un cambio significativo; sin embargo, es importante mencionar que se observa una ligera tendencia a acentuar la proporción de LC3 vesicular en presencia de GAM1. Esto podría deberse a que la sola presencia de una proteína extraña en la célula induzca ligeramente la autofagia, descartamos el hecho de que esto sea un efecto de la transfección pues la internalización de pCDNA no tiene este efecto.

El término del flujo de autofagia, parece que GAM1 no incide en este al menos bajo las condiciones que nosotros medimos. La abundancia de p62 sostiene concentraciones similares aún en presencia de GAM1 durante la autofagia basal, lo que indica que la degradación de componentes blanco de la autofagia, p62 incluido, sigue ocurriendo independientemente de la presencia de GAM1. En conjunto, todos los datos anteriores son interesantes porque indican que, a pesar de que Gam1 es un inhibidor de la SUMOilación y de la muerte celular autofágica inducida por SP/NK₁R, parece no tener repercusiones en la maquinaria de la autofagia.

Existen publicaciones donde se resalta que al menos tres modificaciones post-traduccionales como lo son la fosforilación, la ubiquitinación y la acetilación, son importantes para la autofagia. La fosforilación de LC3 por PKA o PKC inhiben la autofagia⁶¹, la ubiquitinación para marcar los agregados a etiquetar por p62 y que estos puedan ser degradados por la autofagia⁶¹; la acetilación de ATG5, ATG12 entre otros, inhiben la autofagia o incluso la acetilación de HDAC6 de microtúbulos permite la correcta maduración del autofagosoma y su fusión con lisosomas⁶¹. Analizamos bioinformáticamente la posibilidad de que los componentes de la maquinaria central de la autofagia pudieran ser blancos de la SUMOilación, sin embargo, no encontramos sitios consenso en la estructura aminoacídica de estas proteínas. Estos resultados sugieren que la SUMOilación no afecta los conjugados fundamentales para la autofagia. Además, la SUMOilación, a diferencia de otras modificaciones post-traduccionales, parece no tener efecto alguno sobre la maduración de los autofagosomas o el flujo de la autofagia misma. Podemos concluir entonces que, la autofagia basal y la inducida por trehalosa, no son perturbadas de manera directa por la presencia de GAM1 o indirectamente al interferir con la SUMOilación de LC3, ATG5 o ATG12.

Estos resultados apuntan a que el mecanismo por el cual la muerte celular inducida por SP/NK₁R se inhibe en presencia de GAM1 tiene que ver con su papel como inhibidor de la SUMOilación. Otro de los peldaños de la cadena de señalización que ayuda a inducir la muerte es el receptor nuclear NR4A1, que en estudios previos se demostró que se SUMOila, y de manera relevante, que la expresión de *Gam1* disminuye su SUMOilación. En este trabajo estudiamos si la SUMOilación de NR4A1 es necesaria para su papel como inductor de la muerte celular autofágica.

Se diseñaron exitosamente RNAs interferentes contra la región no traducida del NR4A1 endógeno, lo que nos permitió observar la función de una mutante no SUMOilable de NR4A1 en las células, sin el ruido proveniente de la función del receptor silvestre, cuya expresión se induce durante la muerte autofágica. Se observó que la mutante triple en sitios de SUMOilación NR4A1mut fue incapaz de inducir muerte celular, a diferencia de NR4A1 silvestre. Esto es interesante porque a pesar de que se tenía evidencia de que Gam1 afectaba negativamente la muerte celular bajo este modelo, Gam1 tiene un efecto global sobre la SUMOilación de la célula, lo cual dejaba abierta la pregunta de cuál de todos los blancos de la SUMOilación podrían ser trascendentes para este tipo de muerte. Con estos experimentos, comprobamos que al menos uno de los blancos de la SUMOilación es justamente el receptor nuclear NR4A1.

Ahora bien, se tienen otras construcciones de mutantes en sitios de SUMOilación del receptor NR4A1 cuyo papel en la muerte sería interesante evaluar. Entre ellas se encuentran mutantes sencillas de los sitios de SUMOilación y mutantes dobles de los mismos. Sabiendo que la SUMOilación es fundamental para que ocurra la muerte, al evaluar estas mutantes podremos conocer cuál(es) es/son el/los sitio(s) de SUMOilación trascendente(s) para la inducción de muerte bajo este modelo. Lo siguiente sería conocer por qué la SUMOilación de este receptor es importante. Si bien sabemos que la SUMOilación es capaz de modificar las funciones, estabilidad y localización de su proteína blanco, habría que distinguir cuál de estas variables están jugando bajo nuestro modelo de muerte. Ahora, poniendo en contexto la SUMOilación, se sabe que ésta compite con otras modificaciones post-traduccionales como la ubiquitinación y la acetilación, pues todas ellas ocurren en los residuos de lisinas. Es sabido que NR4A1 se ubiquitina y se acetila^{48, 42}. La ubiquitinación o poliubiquitinación, en general, tiende a inducir la degradación mediante el proteosoma, por lo que al competir con la ubiquitinación, estaría confiriéndole estabilidad a la proteína blanco, en este caso a NR4A1 y tenemos evidencias de que hay un incremento en su estabilidad. Ahora bien, la acetilación comúnmente funge como regulador de la actividad transcripcional de NR4A1 o de su estabilidad. Sería interesante estudiar cómo es que las combinaciones de estas modificaciones post-traduccionales interactúan para regular, finamente, la función de este receptor nuclear en la célula, en el contexto de nuestro modelo de muerte. Otro punto interesante sería encontrar si la poliSUMOilación tiene un efecto distinto a la SUMOilación individual de NR4A1 sobre su función como inductor de muerte. Con ello podríamos conocer un poco más acerca de la regulación de NR4A1 y acerca de la importancia de esta modificación post-traduccionales.

Actualmente existe evidencia de que al evitar la SUMOilación del supresor tumoral p53, se inhibe también la inducción de autofagia mediada por el mismo⁶². p53 y NR4A1 son dos proteínas que comparten similitudes en la regulación de su localización celular, por lo tanto también de su función como factores transcripcionales y en su desempeño como inductores de muerte apoptótica⁶³⁻⁶⁶. Con esos datos y a la luz de los resultados de este trabajo podríamos concluir que al inhibir la SUMOilación de NR4A1, éste es incapaz de inducir la muerte autofágica en nuestro modelo inducido por SP/NK₁R, similar a las deficiencias que presenta p53 al evitar su SUMOilación⁶⁷.

XIII. Conclusiones

1. La transfección utilizando PEI se logró exitosamente y con una eficiencia alta.
2. La visualización de LC3 mediante Western Blot se implementó revelando por inmunofluorescencia.
3. Se corroboró el uso de trehalosa como inductor de autofagia.
4. Los siRNAs interferentes contra la región 3'UTR de NR4A1 silencian diferencialmente al endógeno y no al transgen.
5. La presencia de Gam1 no interfiere con el procesamiento de conjugados tipo ubiquitina/SUMO como LC3-II y ATG5-ATG12. Tampoco altera el flujo de la autofagia, determinado por la abundancia de p62 durante la autofagia basal o la autofagia inducida.
6. La SUMOilación de NR4A1 le confiere la habilidad de promover la muerte celular autofágica inducida por SP/NK₁R.

XIV. Perspectivas

A partir de este trabajo sería interesante evaluar cuál es el efecto que tiene la SUMOilación sencilla respecto a la poliSUMOilación de la estructura de las proteínas, estudiando el fenotipo de las mutantes que se tienen del receptor NR4A1 respecto a la autofagia y la muerte celular.

Elucidar los efectos de las posibles combinaciones de la variedad de modificaciones post-traduccionales (ubiquitinación, SUMOilación, fosforilación y acetilación) de NR4A1 en sus funciones, localización y actividad transcripcional, así como sus posibles efectos en la autofagia y en la muerte celular.

Podríamos también explorar la localización intracelular de la triple mutante en sitios de SUMOilación de éste receptor y de mutantes dobles o sencillas del mismo para evaluar algún patrón que correlacione con la muerte inducida o carencia de ésta con estas modificaciones.

XV. Anexo: Preparación de Soluciones

Biología Molecular Crecimiento Bacteriano

Medio LB

(1L)

Triptona 1% (10g)

Extracto de levadura 0.5%(5g)

NaCl 85.55mM (5g)

NaOH 1N (1ml)

Esterilizar en autoclave 121psi por 15 minutos

Medio LB sólido

(1L)

NaCl (10g)

Triptona 1% (10g)

Extracto de levadura 0.5% (5g)

Agar 2% (20g)

Agregar 959 ml de agua bidestilada

Ajustar a pH 7 con NaOH 5N

Aforar a 1 litro y hacer alícuotas de 300 ml

Esterilizar por autoclave a 121psi por 15 minutos

Medio Selectivo

Partiendo de LB sólido, fundir completamente

Esperar hasta que enfríe a una temperatura aceptable al tacto

En condiciones asépticas (frente al mechero):

Agregar el antibiótico de resistencia de acuerdo a:

-El plásmido a transformar

-la concentración correspondiente al antibiótico

Verter el medio con antibiótico a las cajas bacteriológicas, cubriendo aproximadamente la mitad de la caja.

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

Dejar solidificar el medio a temperatura ambiente.

Una vez solidificado el medio, guardar las cajas a 4°C.

Buffer TAE10X

(500ml)

Tris- base (24.2g)

EDTA 0.5M pH8 (10 ml)

Ac. Acético 17.4 M (5.7 ml)

Aforar con agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente

Concentración de trabajo 1X

Buffer TBE 5X

(1L)

Tris- base (54g)

Ácido bórico (27.5g)

EDTA 0.5M pH8 (20 ml)

Aforar con agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente

Concentración de trabajo 0.5X

Medio SOC (super optimal broth with catabolite repression)

(1L)

2% w/v triptona (20g)

0.5% w/v extracto de levadura (5g)

8.6 mM NaCl (0.5 g / l)

2.5 mM KCl (0.186 g / l)

10 mM MgCl₂ (0.952 g / l) o 20mM MgSO₄ (2.408g/L)

20 mM glucosa (3.603 g / l)

Aforar y almacenar a -20°C

Bioquímica

Western Blot

Tris-HCl pH8

(50ml)

Tris- HCl 0.5M (3.03 g)

Aforar con agua destilada y almacenar a 4°C

NaCl

(50ml)

NaCl 1M (2.92 g)

Aforar con agua destilada y almacenar a 4°C

EDTA pH 8

(100ml)

EDTA 0.5M (18.61g)

Ajustar pH utilizando pastillas de NaOH

Aforar con agua destilada y almacenar a temperatura ambiente

Igepal

(15ml)

Igepal 1% (150 μ L)

Aforar con agua destilada y almacenar a 4°C

Deoxicolato 10%

(15 ml)

Deoxicolato 10% (1.5g)

Aforar con agua destilada y almacenar a 4°C

Buffer de lisis

(1 ml)

Tris- HCl 50 mM (100 μ L)

NaCl 100 mM (100 μ L)

EDTA 1 mM (2 μ L)

Igepal 0.05% (50 μ L)

Deoxicolato de sodio 0.25% (25 μ L)

Antes de usar, adicionar una pastilla inhibidora de proteasas por cada 10 ml de buffer (Mini-complete; Roche # 11836 153 001)

Para detección de proteínas fosforiladas, agregar una pastilla inhibidora de fosfatasas por cada 10 ml de buffer (phosSTOP; Roche #04904837001)

Aforar con agua destilada

Solución de Bradford

(Bio Rad#500 0006)

Se usa en proporción 1:4

Nota: Se Prepara al instante

Buffer del Gel Separador: Tris-HCl 1.5M pH 8.8

(150 ml)

Tris base 1.5M (27.23g)

Llevar a pH 8.8 con HCl 6N

Aforar a 150ML

Almacenar a 4°C

Buffer del gel Concentrador

(100 ml)

Tris-base 0.5M (6g)

Llevar a pH 6.8 con HCl 6N

Aforar con agua bidestilada

Persulfato de amonio 10% (APS)

(1ml)

APS (100mg)

Aforar a 1ml con agua bidestilada

Alicuotar y almacenar a 4°C

Buffer de carga para proteínas 5X

(100 ml)

Tris-HCl 0.5 50mM pH6.8

Disolver en 60 ml de agua bidestilada y ajustar pH a 6.8

Agregar:

20% de glycerol (20ml)

2% de SDS (2g)

0.005% De azul de bromofenol (5mg)

Aforar a 100ml con agua bidestilada

Alicuotar y almacenar a 4°C

Se utiliza 1X final

Antes de usar, añadir β - mercaptoetanol a una concentración final de 100 mM

Buffer de Corrida 10X pH8.3

(1l)

Tris base 25mM (30.3g)

Glicina 192mM (144g)

SDS 0.1% (10g)

Aforar a 1L con agua bidestilada

La concentración de trabajo es 1X

Almacenar a 4°C

Buffer de transferencia

(1l)

Glicina 39mM (2.9 g)

Tris base 48mM (5.8 g)

SDS 0.037% (0.37 g)

Metanol 20% (200 ml)

Se prepara al momento, enfriar en hielo o a 4°C

Rojo de Ponceau

(40ml)

Rojo de Ponceau 0.1% (40mg)

Ácido acético 5% (2ml)

Se almacena en oscuridad y a temperatura ambiente

TBS 10X

(1l)

Tris- HCl 200mM, pH7.5 (24.22g)

NaCl 1.5M (87.66g)

Aforar a 1L con agua bidestilada

Almacenar a 4°C

TBST

(1l)

100ml TBS 10X

Tween 20 0.2% (1ml)

Aforar con agua bidestilada

Almacenar a temperatura ambiente

TBST/BSA 5%

(10ml)

1ml TBS10X

10µL Tween 20

50mg BSA

Aforar con agua bidestilada

Leche 5%

(50ml)

2.5g de leche sin grasa

Diluir en TBST

Se prepara al momento

Nota: En el caso de bloqueo con BSA, se pueden bloquear con BSA al 2%

Solución desnudante para remover anticuerpos

(100ml)

B- mercaptoetanol 100mM (700µL)

SDS 2%(20ml SDS 10%)

Tris-HCl 63.5mM (12.5ml Tris-HCl 0.5M pH6.8)

Aforar con agua bidestilada

Preparar al instante

Biología Celular

Crecimiento y mantenimiento celular

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

(1L)

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

NaHCO₃ 44mM (3.7 g)

Ajustar a pH 6.9 con HCl 6N

Aforar y dentro de campana de flujo laminar esterilizar utilizando un filtro de 0.22µm

Suero Fetal Bovino (FBS: Fetal Bovine Serum)

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

Dentro de campana de flujo laminar alicuotar y almacenar a -20°C

Una vez descongelada, la alícuota en uso se mantiene a 4°C

GPS 100X (Glutamina/Penicilina/Estreptomicina)

(100ml)

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

300mg de penicilina

500mg de estreptomicina

Aforar y dentro de campana de flujo esterilizar por filtración utilizando una membrana de 0.22µm y alicuotar

Al descongelar la alícuota en uso se mantendrá a 4°C

Tripsina 0.25%

(10ml)

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

9ml de Verseno (GIBCO #15040-066)

Dentro de campana de flujo mezclar

Almacenar a 4°C

Buffer salino de fosfatos (PBS) 10X

(1L)

NaCl 136 mM (80g)

KCl 2mM (2g)

Na₂HPO₄ 10mM (14.4g)

KH₂PO₄ 1mM (2.4g)

Disolver en 900ml de agua bidestilada y aforar a 1L

En campana de flujo laminar, esterilizar por filtración utilizando una membrana de 0.22 μm

Almacenar a temperatura ambiente

La dilución de trabajo es 1X

Medio DMEM suplementado

(250ml)

220ml de medio D-MEM

25ml de FBS (10% final)

2.5ml de GPS 100X (1X final) 2.5 ml de piruvato de sodio (GIBCO #11360-070)

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

Dentro de la campana de flujo laminar, mezclar y almacenar a 4°C

Medio de congelación 2X

(1ml)

6ml de D-MEM

2ml de FBS (20% final)

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

Inmunocitoquímica

Praformaldehido 4%

(50ml)

Paraformaldehido (2g)

Disolver en agua destilada a 70°C (es importante que no ebulle)

Agregar 2-3gotas de NaOH 5M (hasta que la solución alcance la transparencia)

Aforar y almacenar a -20°C

Nota: Una vez descongelada cada alícuota es recomendable desecharla

Tritón/PBS 2%

(2ml)

Tritón (4 µL)

Aforar con PBS1X

BSA/PBS 4%

(2ml)

BSA (80mg)

Aforar con PBS1X

BSA 2%

(2ml)

BSA (40mg)

Aforar con PBS1X

Suero de cabra 4% en BSA/PBS 4%
(2ml)

Suero de Cabra 80 μ L

Aforar con BSA/PBS 4%

Transfección por CaCl_2

HBS 2X:

(100ml)

NaCl 273 mM (1.6g)

KCl 9.9 mM (0.074g)

Na_2HPO_4 2.8 mM (0.04g)

Dextrosa 11 mM (0.2g)

HEPES 41 mM (1g)

Disolver en agua grado cultivo

Aforar y repartir en tres contenedores diferentes, cada solución se llevará a un pH distinto (6.9, 7 y 7.1)

Determinar experimentalmente cuál de los buffers (a distintos pHs) lleva a una mejor eficiencia de transfección (mínimo 70%). Transfectar un plásmido que contenga la proteína reportera GFP.

Alicuotar el buffer que de mayor eficiencia de transfección y almacenar a -70°C

CaCl_2 2M

(5ml)

1.472g CaCl_2

Aforar con agua grado cultivo

Dentro de campana de flujo laminar filtrarlo utilizando unidad de filtración de $0.22\mu\text{m}$

Alicuotar y almacenar a -70°C

Transfección por PEI (polietilenimina)

Preparación de Stock PEI 10X

(200ml)

10mg/ml de PEI, disolver a 80°C en ddH₂O

Alicuotar y almacenar a -20°C

Preparar PEI 1X

Redisolver stock 10X a 80°C en ddH₂O

Neutralizar pH a 7.2 con HCl

Filtrar con unidad de filtración de 0.22 µm

Alicuotar y almacenar a -80°C (hasta 4 meses)

Determinar la proporción de PEI: DNA experimentalmente cada vez que se descongele una nueva alícuota 1X. La proporción recomendada es 3:1(PEI: DNA).

Viabilidad Celular

Azul de tripano 0.04%

(10 ml)

1ml de azul de tripano 0.4%

Aforar con PBS 1X y en campana filtrar (0.22µm)

Buffer de Fosfato de Potasio pH7,5

(200ml)

Fosfato de potasio 500mM (14.196 g)

Aforar con PBS 1X y ajustar pH7.5

Buffer piruvato

(10ml)

Piruvato 100mM (6.95 μ L)

Aforar con PBS 1X

Buffer de lisis 10X

(50 ml)

Triton (15 ml)

Fosfato de potasio 50 mM (5 ml)

Aforar con agua destilada

Muerte celular inducida por SP**Sustancia P**

(SP, Sigma-Aldrich #S6883)

Disolver todo el contenido en el volumen necesario de agua grado cultivo para obtener una concentración 100 μ m

XVI. Bibliografía

1. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313–26 (2010).
2. Manuscript, A. Eaten alive : a history of macroautophagy. **12**, 814–822 (2013).
3. Ferraro, E. & Cecconi, F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **462**, 210–9 (2007).
4. Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161–70 (2011).
5. Duszenko, M. *et al.* Autophagy in protists. *Autophagy* **7**, 127–158 (2011).
6. Levine, B., Klionsky, D. J. & Arbor, A. Development by Self-Digestion : Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy Review. **6**, 463–477 (2004).
7. Yorimitsu, T. & Klionsky, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1542–52 (2005).
8. Meléndez, A. & Neufeld, T. P. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* **135**, 2347–60 (2008).
9. Komatsu, M. *et al.* Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in. **169**, 425–434 (2005).
10. Russell, R. C., Yuan, H.-X. & Guan, K.-L. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* **24**, 42–57 (2014).
11. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–41 (2011).
12. Campoy, E. & Colombo, M. I. Autophagy in intracellular bacterial infection. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1465–77 (2009).
13. Cullinane, M. *et al.* nd es io s ci en ce . D o no t st r ib u te io s en ce o r u . 744–753 (2008).
14. Shintani, T. & Klionsky, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990–5 (2004).
15. Klionsky, D. J. *et al.* Do not distribute . © 2011 Landes Bioscience . 1273–1294 (2011).

16. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132–41 (2011).
17. Kim, K. H. & Lee, M.-S. Autophagy-a key player in cellular and body metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 322–37 (2014).
18. Matsunaga, K. *et al.* Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* **190**, 511–21 (2010).
19. Agholme, L. *et al.* of assays for monitoring autophagy © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . 445–544 (2012).
20. Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A. & Rubinsztein, D. C. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* **282**, 5641–52 (2007).
21. Casarejos, M. J. *et al.* The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* **58**, 512–20 (2011).
22. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. **221**, 3–12 (2010).
23. Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. ‘Protein modifications: beyond the usual suspects’ review series. *EMBO Rep.* **9**, 859–64 (2008).
24. Kuma, A. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032–6 (2004).
25. Tsukamoto, S. *et al.* Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* **321**, 117–20 (2008).
26. Denton, D., Nicolson, S. & Kumar, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* **19**, 87–95 (2012).
27. Mizushima, N. & Levine, B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* **12**, 823–30 (2010).
28. Cann, G. M. *et al.* Developmental expression of LC3alpha and beta: absence of fibronectin or autophagy phenotype in LC3beta knockout mice. *Dev. Dyn.* **237**, 187–95 (2008).
29. Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742–58 (2011).
30. Ameisen, J. C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* **9**, 367–93 (2002).

31. Yuan, J. & Horvitz, H. R. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* **116**, S53–6, 1 p following S59 (2004).
32. Yuan, J. & Kroemer, G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev.* **24**, 2592–602 (2010).
33. Clarke, P. G. H. Anatomy and Embryology Review articles Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms. 195–213 (1990).
34. Elmore, S. Toxicologic Pathology. (2007). doi:10.1080/01926230701320337
35. Bursch, W., Ellinger, a, Gerner, C., Fröhwein, U. & Schulte-Hermann, R. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **926**, 1–12 (2000).
36. Ouyang, L. *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* **45**, 487–98 (2012).
37. Galluzzi, L. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **14**, 1237–43 (2007).
38. Castro-Obregón, S. *et al.* A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death. *Cell Death Differ.* **9**, 807–17 (2002).
39. Bouzas-Rodríguez, J. *et al.* The nuclear receptor NR4A1 induces a form of cell death dependent on autophagy in mammalian cells. *PLoS One* **7**, e46422 (2012).
40. Castro-Obregón, S. *et al.* Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. *J. Biol. Chem.* **279**, 17543–53 (2004).
41. Zhao, Y. & Bruemmer, D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1535–41 (2010).
42. Campos-melo, D. *et al.* Nur transcription factors in stress and addiction. **6**, 1–13 (2013).
43. Hsu, H.-C., Zhou, T. & Mountz, J. D. Nur77 family of nuclear hormone receptors. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* **3**, 413–23 (2004).
44. Maxwell, M. a & Muscat, G. E. O. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e002 (2006).
45. Hawk, J. D. & Abel, T. The role of NR4A transcription factors in memory formation. *Brain Res. Bull.* **85**, 21–9 (2011).
46. Wingate, a D. & Arthur, J. S. C. Post-translational control of Nur77. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 1107–9 (2006).

47. Berrabah, W., Aumercier, P., Lefebvre, P. & Staels, B. Control of nuclear receptor activities in metabolism by post-translational modifications. *FEBS Lett.* **585**, 1640–50 (2011).
48. Kang, S.-A. *et al.* Regulation of Nur77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 867–73 (2010).
49. Boggio, R., Passafaro, A. & Chiocca, S. Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 15376–82 (2007).
50. Jentsch, S. & Psakhye, I. Control of Nuclear Activities by Substrate-Selective and Protein-Group SUMOylation. *Annu. Rev. Genet.* (2013). doi:10.1146/annurev-genet-111212-133453
51. Neyret-Kahn, H. *et al.* Sumoylation at chromatin governs coordinated repression of a transcriptional program essential for cell growth and proliferation. *Genome Res.* **23**, 1563–79 (2013).
52. Matunis, M. J. Review SUMO : A Multifaceted Modifier of Chromatin Structure and Function. 1–12 (2013). doi:10.1016/j.devcel.2012.11.020
53. Chiocca, S. *et al.* Identification of a novel antiapoptotic protein , GAM-1 , encoded by the CELO adenovirus . Identification of a Novel Antiapoptotic Protein , GAM-1 , Encoded by the CELO Adenovirus. **71**, (1997).
54. Chiocca, S. *et al.* Histone deacetylase 1 inactivation by an adenovirus early gene product. *Curr. Biol.* **12**, 594–8 (2002).
55. Boggio, R., Colombo, R., Hay, R. T., Draetta, G. F. & Chiocca, S. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol. Cell* **16**, 549–61 (2004).
56. Lebovitz, C. B., Bortnik, S. B. & Gorski, S. M. Here, there be dragons: charting autophagy-related alterations in human tumors. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1214–26 (2012).
57. Puyal, J., Ginet, V., Grishchuk, Y., Truttmann, A. C. & Clarke, P. G. H. Neuronal autophagy as a mediator of life and death: contrasting roles in chronic neurodegenerative and acute neural disorders. *Neuroscientist* **18**, 224–36 (2012).
58. Rabinowitz, J. D. & White, E. Autophagy and metabolism. *Science* **330**, 1344–8 (2010).
59. Sanjuan, M. a *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**, 1253–7 (2007).
60. Ni, H.-M. *et al.* Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy* **7**, 188–204 (2011).
61. McEwan, D. G. & Dikic, I. The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol.* **21**, 195–201 (2011).

62. Naidu, S. R., Lakhter, A. J. & Androphy, E. J. PIASy-mediated Tip60 sumoylation regulates p53-induced autophagy Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . 2717–2728 (2012).
63. Santiago, A. *et al.* p53 SUMOylation promotes its nuclear export by facilitating its release from the nuclear export receptor CRM1. **24**, (2013).
64. Moll, U. M., Marchenko, N. & Zhang, X.-K. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* **25**, 4725–43 (2006).
65. Liu, J. *et al.* Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* **147**, 223–34 (2011).
66. Fan, J. *et al.* Sumoylation is critical for DJ-1 to repress p53 transcriptional activity. **582**, 1151–1156 (2008).
67. Stindt, M. H., Carter, S. a., Vigneron, A. M., Ryan, K. M. & Vousden, K. H. MDM2 promotes SUMO-2/3 modification of p53 to modulate transcriptional activity. *Cell Cycle* **10**, 3176–3188 (2011).
68. Wang, Y. & Qin, Z. Coordination of autophagy with other cellular activities. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 585–94 (2013).
69. Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 81–94 (2014).
70. Sun, Y. *et al.* Inhibition of autophagy ameliorates acute lung injury caused by avian influenza A H5N1 infection. *Sci. Signal.* **5**, ra16 (2012).
71. Mattosio, D., Segré, C. V & Chiocca, S. Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: The SUMO lesson. *World J. Virol.* **2**, 79–90 (2013).

Fuentes electrónicas consultadas

NCBI. Febrero 27, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Uniprot, Marzo, 4 2014. <http://www.uniprot.org/>