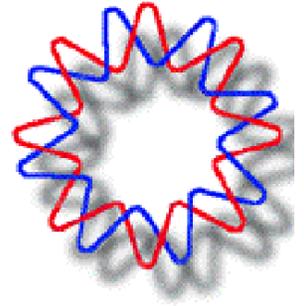




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



Instituto de Biotecnología

***Estudio de las bases moleculares para regular la
autofagia por el receptor nuclear NR4A1***

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Maestra en Ciencias Bioquímicas

Presenta

Biol. Dámaris Anell Rendón

Directora de Tesis

Dra. Susana Castro Obregón

Cuernavaca, Morelos. Enero de 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

A mi abuelo y a mis padres, por su constante e invaluable apoyo a lo largo de mi vida académica y personal, y a quienes debo en gran medida el desarrollo de mi vocación científica.

A la doctora Susana Castro Obregón, por su valiosa guía, apoyo y motivación que hicieron posible este trabajo.

A las doctoras Leonor Pérez y Lourdes Massieu, por sus acertados comentarios, aportaciones y críticas que ayudaron a enriquecer y desarrollar este trabajo.

A los doctores Jörn Glökler, Zoltán Konthur y Katja Nowick, del Instituto Max Planck de Genética Molecular en Berlín, Alemania, por su colaboración y apoyo durante mi estancia en dicho instituto.

Agradezco el apoyo técnico de Concepción Valencia y administrativo de Minerva Carcaño.

Al doctor Pedro Lazo, por proporcionarnos el vector de expresión de DRAM.

Este trabajo fue financiado por los donativos PAPIIT IN221909, CONACYT 106598, ICGEB MEX06/03 y Fundación Alexander von Humboldt a SCO. Beca CONACYT 48006 a DAR.

ABREVIATURAS.

AMPK, cinasa activada por AMP.

Atg, genes relacionados a la autofagia.

DRAM, modulador de la autofagia regulado por daño.

IGF1R, receptor de factor de crecimiento tipo insulina 1.

LC3, cadena ligera de la proteína 1 asociada a microtúbulos.

mTOR, blanco de rapamicina en mamíferos.

NK₁R, receptor de neuroquininas 1.

NR4A1, receptor nuclear de la subfamilia 4, grupo A, miembro 1.

SELEX, evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial.

SP, sustancia P.

RESUMEN.

La autofagia es el principal mecanismo celular de catabolismo y degradación de organelos y proteínas de vida media larga, cuya activación responde a diversas señales de estrés intracelular o extracelular. Dependiendo de las señales recibidas y del contexto celular, la autofagia puede favorecer la supervivencia de la célula, o bien desembocar en muerte celular, contribuyendo al delicado balance entre crecimiento, proliferación y muerte celular en el organismo. La pérdida de control en dichos procesos resulta en enfermedades como el cáncer. El entendimiento de los mecanismos que regulan la autofagia es crucial para combatir de manera más eficaz a dicha patología.

La muerte celular autofágica funciona también como un mecanismo de seguridad para la eliminación de células dañadas o malignas cuando la apoptosis se encuentra bloqueada. Nuestro grupo de investigación ha encontrado que el receptor nuclear NR4A1 juega un papel crucial, en diversos modelos, como modulador de la muerte autofágica. Es nuestro objetivo entender el mecanismo molecular por el cual NR4A1 modula la autofagia.

NR4A1 actúa como factor de transcripción, e induce la expresión de diversos genes, algunos de ellos relacionados con el metabolismo de la glucosa. Además, es capaz de interactuar directamente con otras proteínas, entre ellas p53, proteína involucrada en la muerte celular y que puede inducir autofagia al activar al gen DRAM (modulador de autofagia regulado por daño). La inducción de autofagia por p53 se encuentra vinculada con la inhibición de la cinasa mTOR, la cual regula el crecimiento y proliferación celular al integrar señales acerca de la disponibilidad de nutrientes y balance energético de la célula, además de ser un regulador negativo de la autofagia. Un descenso en los niveles intracelulares de ATP (balance energético) también inhibe la actividad de mTOR, aumentando la magnitud de la autofagia.

En este trabajo proponemos que NR4A1 puede modular la autofagia ya sea por medio de interacciones con proteínas involucradas con la regulación de este proceso para permitir ya sea la inhibición de mTOR o la activación de DRAM, o bien provocando un descenso en los niveles intracelulares de ATP al inducir la expresión de genes gluconeogénicos.

Encontramos que durante la progresión de la muerte autofágica inducida por la interacción de NK1R con su ligando SP no se observó un decremento en los niveles de ATP ni activación de AMPK (cinasa sensible a los niveles de ATP). Aunque se confirmó la interacción de NR4A1 con p53, no se observaron cambios significativos en la expresión de DRAM durante la muerte celular. Considerando que el mecanismo de NR4A1 para promover la muerte autofágica podría involucrar la transcripción de otros genes blanco, se buscó inhibir su actividad transcripcional sin interferir con su habilidad para interactuar con otras proteínas. Para esto, se hizo una selección de aptámeros específicos que podrían inhibir su unión al DNA, obteniendo diversos oligómeros que podrían ser útiles para este fin.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN	7
▪ Generalidades de la autofagia	7
▪ Maquinaria central de la autofagia	8
▪ Regulación de la autofagia	10
▪ Muerte celular autofágica	12
ANTECEDENTES	14
▪ Modelos de muerte celular autofágica.....	14
▪ El receptor nuclear NR4A1 media la muerte autofágica.....	16
▪ Proteínas relacionadas con la regulación de la autofagia que podrían ser moduladas por NR4A1.....	19
- p53	
- DRAM	
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
▪ Cultivo de células.....	25
▪ Transfección transiente por CaCl ₂	27
▪ Modelo de muerte celular autofágica inducida por SP/NK ₁ R.....	29
▪ Obtención de extractos a partir de células adherentes.....	30
▪ Western blot.....	33
▪ Medición de niveles de ATP en células HEK392T en condiciones de muerte autofágica.....	38
RESULTADOS	41
1. Modelo de muerte autofágica mediada por NK ₁ R/SP.....	41
2. mTOR se mantiene inactiva durante la muerte autofágica.....	43
3. Los niveles intracelulares de ATP no disminuyen durante la muerte autofágica.....	44
4. AMPK no se activa durante la muerte autofágica.....	48
5. La expresión de DRAM no aumenta de forma significativa.....	49
6. Selección de aptámeros específicos para NR4A1.....	51

DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	61
PERSPECTIVAS.....	61

INTRODUCCIÓN.

Generalidades de la autofagia.

La palabra autofagia deriva del griego, y su significado es “comerse a sí mismo”. La autofagia es el principal mecanismo catabólico de degradación y reciclamiento de organelos y proteínas de vida media larga. Se encuentra activa en todas las células del organismo a nivel basal y se induce por condiciones de estrés tanto intracelulares (acumulación de componentes u organelos dañados) como extracelulares (carencia de nutrientes, hipoxia, alta densidad celular, cambios de temperatura, etc.), prolongando la supervivencia celular al obtener nutrientes por medio del reciclaje de sus componentes, durante periodos cortos de ayuno. Además, contribuye a la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Yang and Klionsky 2010).

Se ha propuesto que la falta de control en la regulación de la autofagia juega un papel importante en enfermedades como el cáncer (Chen 2010), la neurodegeneración (Wong 2010), enfermedades musculares (Levine and Klionsky 2004), entre otras.

Existen tres mecanismos de autofagia: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas, que se distinguen una de otra con respecto a la ruta por medio de la cual transportan los componentes citoplásmicos que serán degradados por los lisosomas. Sin embargo, las tres rutas convergen en los pasos finales de la degradación lisosómica de los materiales para su posterior reciclamiento (Levine and Klionsky 2004). En la microautofagia, el contenido citoplásmico es envuelto directamente por invaginación, evaginación o segmentación de la membrana lisosomal. En cambio, en la macroautofagia se lleva a cabo la formación de vesículas citoplásmicas de doble membrana a partir de estructuras membranosas conocidas como membranas de aislamiento o precursores de autofagosomas, que “secuestran” porciones del citoplasma llamadas autofagosomas; éstas se fusionan con los lisosomas para dar paso así a la degradación de la membrana interna del fagosoma y del material citoplásmico que se engulló. A esta estructura morfológica consistente en la fusión del cuerpo autofágico con el lisosoma se le llama fagolisosoma (esquematisado en la figura 1). Finalmente, en la autofagia mediada por chaperonas se ha reportado un transporte directo y selectivo de proteínas citosólicas hacia el lumen lisosomal (Ogier-Denis and Codogno 2003).

En adelante, se utilizará el término “autofagia” para referirse a la macroautofagia, pues nuestro estudio se centrará en este mecanismo en particular.

La autofagia es un proceso que ocurre en todas las células eucariontes, y se encuentra conservado evolutivamente. Genes ortólogos relacionados con la autofagia (llamados Atg) han sido identificados en diversos organismos eucariontes, desde las levaduras hasta los mamíferos. Muchos de los genes Atg (pero no todos), encontrados inicialmente en la levadura, tienen candidatos ortólogos equivalentes en eucariontes avanzados. Esto ha permitido el estudio de los mecanismos moleculares de la autofagia en diferentes modelos animales, y gracias al alto grado

de conservación evolutiva de dichos genes, ha sido posible utilizar el conocimiento obtenido del estudio del mecanismo autofágico de la levadura (por medio de la investigación de mutantes con defectos en el crecimiento de las células en medio pobre en nitrógeno, lo cual permitió identificar a los genes relacionados con la autofagia) como base para generar avances acerca del funcionamiento del mismo en otros eucariontes avanzados. En dichos organismos, la inactivación de los genes Atg ha revelado un papel importante en muchos aspectos del desarrollo, como el crecimiento normal reproductivo, envejecimiento, adaptaciones inducidas por estrés, muerte celular y control del crecimiento celular (Levine and Klionsky 2004).

Maquinaria central de la autofagia.

La cinasa PI3 tipo III (también conocida como Vps34), cuyo complejo incluye a Beclin-1 (Atg6), p150 (Vps15 en levadura) y Atg14, promueve la nucleación de vesículas autofágicas. En células en condiciones de carencia de nutrientes, dichas proteínas son reclutadas hacia una membrana asociada al retículo endoplásmico, llamada omegasoma. También existe presencia del complejo de la PI3K tipo III en la cara trans del aparato de Golgi (Tooze 2010).

La expansión de las vesículas autofágicas es mediada por dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina, pues proteínas con actividad de ligasas tipo E1, E2 y E3 catalizan dichos procesamientos, que dan lugar a los complejos de proteínas Atg12-Atg5 y Atg8 (LC3). El sistema de Atg7-Atg10 conjuga a Atg12 con Atg5, la conjugación del dímero Atg12-Atg5 se multimeriza con Atg16, y este complejo se transloca a la membrana de aislamiento y es importante para la elongación de la membrana del autofagosoma (Mizushima, Yoshimori et al. 2010). LC3 es la cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos (MAP1). Dicha proteína se encuentra normalmente distribuida a través del citoplasma, pero al inducirse la autofagia, LC3 es conjugada con fosfatidiletanolamina (dando lugar a la forma LC3-II) por el sistema Atg7-Atg3-Atg4 (ver figura 1), y se transloca a las membranas de aislamiento, manteniéndose presente aún en los fagolisosomas, característica que la convierte en el único marcador confiable de autofagosomas. Un tercer complejo, donde se encuentra Atg9, parece ser el acarreador de los fragmentos de membrana que elongan el fagosoma hasta la fusión de los extremos de las membranas de aislamiento, lo cual resulta en la formación del autofagosoma (Xie and Klionsky, 2007) (Figura 1). En levadura se ha encontrado que Atg9 se encuentra circulando entre el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) y una poza periférica compuesta por vesículas y túbulos que usualmente se encuentran adyacentes a mitocondrias. En mamíferos, Atg9 transita entre el endosoma y un compartimento de Golgi próximo al núcleo en células con disponibilidad de nutrientes, y se relocaliza a un compartimento periférico tras la ausencia de nutrientes (Tooze 2010). La fuente de la membrana para la elongación es aún controversial, aunque hay evidencias de que proviene del RE, de la membrana externa de la mitocondria, o de la membrana plasmática (Tooze 2010).

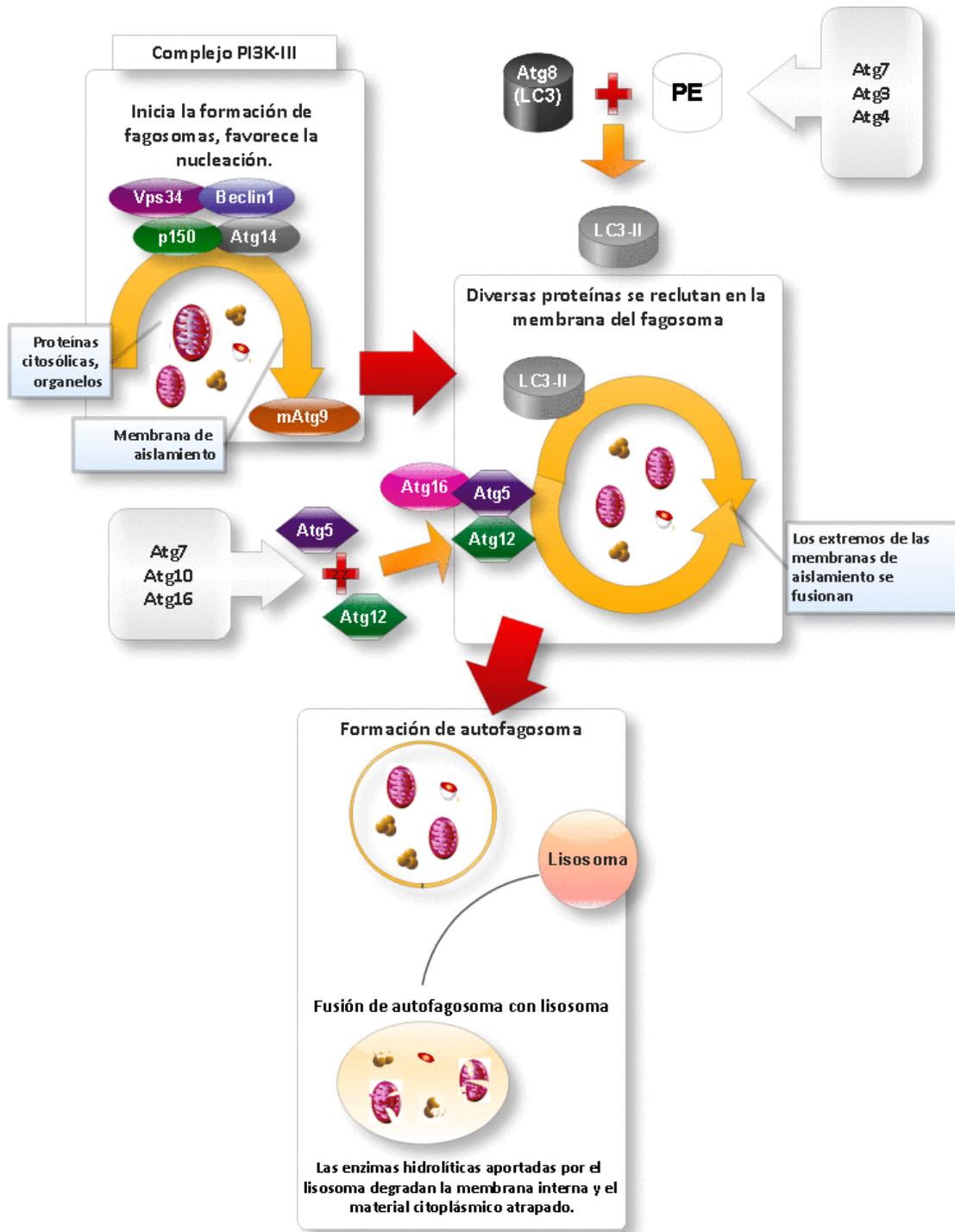


Figura 1. Esquema de la formación de autofagosomas. Para detalles, ver el texto.

Regulación de la autofagia.

La autofagia está controlada por varias cinasas. La cinasa AMPK (cinasa activada por AMP) sensa los niveles de AMP y regula los de ATP y su activación puede inducir autofagia de manera indirecta (Hardie 2007). Otra cinasa, mTOR (blanco de rapamicina en mamíferos), funciona como un regulador negativo de la autofagia, suprimiéndola (Faivre, Kroemer et al. 2006).

Una de las rutas centrales de señalización que coordina las respuestas celulares al estrés metabólico es la ruta de IGF1-AKT-mTOR. mTOR es una cinasa que actúa como regulador maestro del metabolismo celular, integrando señales que determinan la ruta a tomar entre anabolismo y catabolismo, así como crecimiento y proliferación. Se ha identificado a mTOR como parte de una cascada de cinasas, por debajo de la activación de PI3K-I (Tooze 2010).

La privación de nutrientes o energía puede señalar a AMPK, la cual monitorea los niveles intracelulares de ATP (al detectar la proporción entre AMP y ATP) y regula negativamente a mTOR (Hardie 2007). Bajo condiciones donde no hay estrés, mTOR suprime la autofagia mientras que la privación de nutrientes reprime la señalización de mTOR, activando el proceso catabólico de la autofagia como una respuesta adaptativa al estrés metabólico (Meijer and Codogno 2008).

El decremento en el ATP intracelular activa a AMPK. Al activarse fosforila a efectores que inhiben la actividad de mTOR, como el complejo de esclerosis tuberosa 2 o TSC2. La proteína Rheb es un regulador positivo de la actividad de mTOR; Rheb requiere estar unida a GTP para interactuar con mTOR. Al ser activada, TSC2 es capaz de unirse a Rheb e hidrolizar el GTP asociado con Rheb, convirtiéndolo en GDP y así evitando la activación de mTOR por interacción con la proteína Rheb (Castro, Rebhun et al. 2003), estableciendo así un vínculo entre un decremento en los niveles intracelulares de ATP y la inhibición de la actividad de mTOR (ver figura 2).

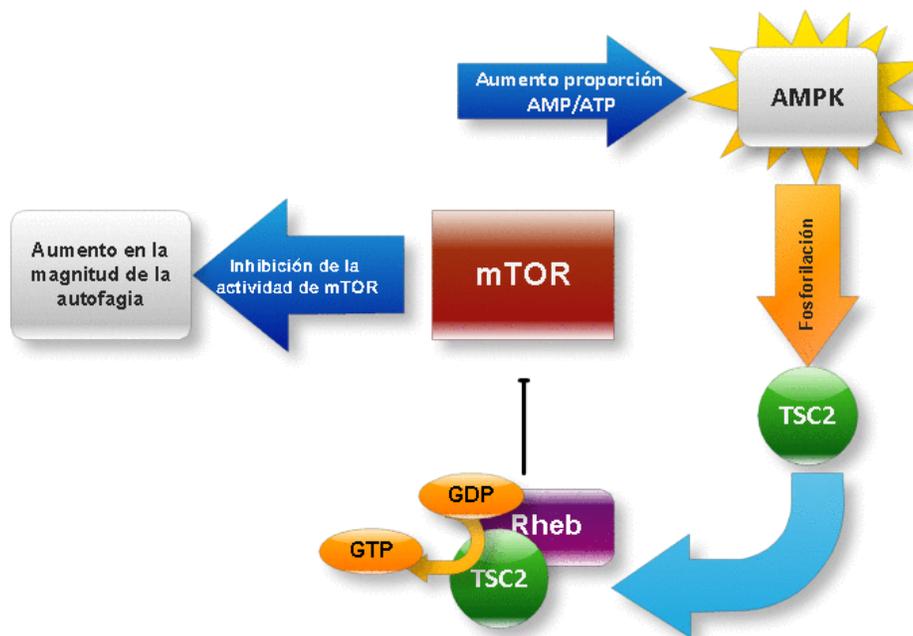


Figura 2. Inhibición de mTOR, mediada por AMPK. La baja en los niveles de ATP (lo cual incrementa la proporción de AMP en la célula) es detectada por la cinasa AMPK, activándola, y así, provocando la fosforilación de efectores que previenen la activación de mTOR (TSC2).

mTOR tiene un importante papel en la regulación de la muerte celular programada, donde la determinación del destino celular depende del contexto de la célula así como de la acción e interacciones de otras proteínas como p53, Bcl-2, Bad (Castedo, Ferri et al. 2002). La actividad de mTOR determina el crecimiento y la proliferación de las células, lo cual resulta de gran interés en la investigación del cáncer, perfilando a mTOR como un posible blanco para la regulación del crecimiento tumoral. De manera interesante, una sobreactivación de la señalización de mTOR ha sido vinculada al cáncer, diabetes tipo 2 y envejecimiento (Meijer and Codogno 2008).

Se ha encontrado que en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la actividad de AMPK se incrementa en mutantes nulos para S6K, proteína fosforilada por mTOR como parte de la cascada de señalización activa al no haber condiciones de estrés. Dichos mutantes muestran un incremento en la fosforilación de la unidad catalítica de AMPK, lo cual es consistente con una mayor actividad de AMPK. Esto implica que la pérdida de S6K incrementa la actividad de AMPK, lo que resulta en organismos más longevos con respecto a los tipos silvestres. Dicho efecto también se ha observado en ratones (Colin Selman, et al. 2009).

Dichos hallazgos sugieren que la manipulación de la vía de señalización de mTOR/S6K puede ser una estrategia terapéutica interesante para tratar enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

De los diferentes procesos celulares afectados por la autofagia, nuestro estudio se centra en la muerte celular ya que su regulación correcta es esencial para el desarrollo embrionario, el funcionamiento del sistema inmune y la homeostasis de las células en el adulto.

Muerte autofágica.

Bajo ciertas circunstancias, la autofagia -en lugar de prolongar la supervivencia de la célula- puede resultar en muerte celular, provocando así la llamada muerte autofágica, cuya característica distintiva es la presencia de vesículas autofagosómicas o autolisosómicas. Se determina que una muerte es autofágica cuando las células sobreviven al inhibir a la maquinaria molecular de la autofagia.

El programa de muerte celular autofágica se induce cuando se detectan ciertas señales de estrés, como daño al DNA. La muerte autofágica también ocurre durante las etapas tempranas del desarrollo, y en algunos casos funciona como un mecanismo modelador donde muerte celular masiva es requerida: durante la metamorfosis de insectos, en la formación de miembros en aves, y la formación del paladar en los mamíferos (Gozuacik and Kimchi 2007). Este tipo de muerte autofágica que ocurre durante el desarrollo es conocida como muerte celular programada tipo II.

Es necesario distinguir entre las situaciones en las cuales la célula es eliminada por medio de la muerte autofágica, y aquellas donde la autofagia, como un proceso catabólico que recicla nutrientes, se activa como una estrategia para prolongar la supervivencia de la célula en condiciones de estrés. Se ha observado que estímulos citotóxicos (etoposida, estaurosporina, taspigargina) activan la muerte celular autofágica en células que no pueden realizar apoptosis, como aquellas que expresan las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 o Bcl- x_L , o que carecen tanto de Bax como Bak, que son miembros de la familia Bcl-2 que promueven la apoptosis al regular el potencial de la membrana mitocondrial, haciéndola permeable (Shimizu, Kanaseki et al. 2004) (Wei, Zong et al. 2001). La muerte celular, que ocurre por autofagia en estos casos, puede ser inhibida al bloquear la formación de autofagosomas con inhibidores de la PI3K, como la 3-metiladenina y wortmanina, o por medio del silenciamiento de los genes Atg5 y Atg6 (Shimizu, Kanaseki et al. 2004).

En cambio, en los fibroblastos de embrión de ratón deficientes en Bax/Bak cultivados en ausencia de aminoácidos, como en células sin deficiencia de Bax/Bak, el mecanismo autofágico se activa como una estrategia para prolongar la supervivencia de las células, en respuesta a la señal de carencia de nutrientes; en este caso las células mueren, a menos que se les proporcionen aminoácidos. (Tsujiyama and Shimizu 2005). En una situación así, la inhibición de la autofagia de hecho resultaría en un incremento en la muerte celular, indicando que dicha muerte no depende de la acción de la maquinaria autofágica.

La muerte autofágica, a diferencia de la muerte “pasiva” conocida -como la necrosis-, es un tipo de muerte celular programada. La autofagia y la apoptosis (también conocida como muerte tipo I) se encuentran estrechamente relacionadas, y existe una compleja ruta de regulación que, bajo condiciones de estrés inductor de muerte, decide entre la acción de un mecanismo y otro.

Otro valioso parámetro para identificar un tipo de muerte asociado a vesículas como autofágica, es la detección de LC3 y su forma lipídada, LC3-II. Por microscopía electrónica se mostró que en las células deficientes de Bax/Bak tratadas con sustancias citotóxicas contienen numerosas vesículas

de doble membrana, que fueron identificadas como autofagosomas por la distribución puntuada de GFP-LC3 (Shimizu, Kanaseki et al. 2004).

Entender la regulación de la autofagia tiene un potencial impacto en la medicina. Debido al papel dual que posee la autofagia (promoviendo la supervivencia o la muerte celular, según el contexto celular), puede favorecer el desarrollo del cáncer o puede contribuir a la eliminación de células tumorales. En etapas tempranas de tumorigénesis, la autofagia funciona como un mecanismo de supervivencia que permite a las células malignas proliferar en condiciones de alta densidad celular, hipoxia, carencia de nutrientes y exposición a agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, en etapas avanzadas, la muerte autofágica ayuda a eliminar las células cancerosas. (Cuervo 2004).

Además, la autofagia tiene un papel preventivo del desarrollo de neoplasias, al proteger al genoma de rearrreglos cromosómicos peligrosos que promueven la tumorigénesis, ya que se ha observado que la pérdida de Beclin-1 (gen pro-autofágico) favorece la aparición de aneuploidías (Mathew 2007). De hecho, la pérdida de un alelo de Beclin-1 es suficiente para la generación de tumores en ratón (Yue, Jin et al. 2003), y se encuentra mutado en gran cantidad de tumores humanos (Qu, Yu et al. 2003).

Muchas alteraciones que se asocian con tumorigénesis, como la activación o amplificación de oncoproteínas y la mutación o inactivación de proteínas supresoras de tumores, regulan la ruta autofágica de manera negativa, sugiriendo que los niveles basales de autofagia pueden funcionar como un mecanismo supresor de tumores (Galluzi, Morsellia et al., 2010).

Se piensa que las fallas en la autofagia favorecen la aparición de tumores al provocar la acumulación de organelos y proteínas dañados, lo cual incrementa el estrés celular. Por ejemplo, la acumulación de mitocondrias dañadas, que en condiciones normales se degradan por autofagia (proceso llamado mitofagia), provoca un aumento en el estrés oxidativo. Además, una disminución en la autofagia y la apoptosis favorece la necrosis e inflamación, ya que, en respuesta a estrés metabólico, se reclutan células inflamatorias como células T citotóxicas y células NK, las cuales provocan un estado de inflamación crónica que puede promover el surgimiento de tumores. En contraste, la inducción de autofagia puede ser utilizada también como estrategia terapéutica, por ejemplo, se ha observado que la autofagia es necesaria para el establecimiento de senescencia inducida por oncogenes, la cual frena el desarrollo de malignidades. (Chen, Debnath 2010). Por lo tanto, es de gran relevancia descubrir los mecanismos moleculares de su regulación, para proponer blancos terapéuticos que nos permitan modularla.

ANTECEDENTES.

Modelos de muerte celular autofágica.

En nuestro grupo de investigación se ha observado que la participación del receptor nuclear NR4A1 es esencial en tres modelos diferentes de muerte autofágica.

En el primer modelo, la interacción entre el receptor de neuroquininas 1 (NK₁R) y su ligando, un undecapéptido llamado Sustancia P (SP), induce una forma de muerte celular programada no apoptótica independiente de activación de caspasas y con características macroautofágicas (acumulación de vesículas de doble membrana positivas para LC3-II, membrana plasmática y núcleo intactos, dependencia de la maquinaria autofágica para la progresión de la muerte). Dicha forma de muerte celular inducida por SP se observó en cultivos primarios de neuronas del hipocampo, del cuerpo estriado y neuronas corticales, así como en células embrionarias de riñón humano que fueron transfectadas con NK₁R (Castro-Obregon, del Rio et al. 2002).

En estudios posteriores, se observó que la muerte celular inducida por NK₁R activado por SP, es mediada por una cascada de fosforilación de MAPK, reclutadas por la proteína de andamiaje arrestina 2. La activación de las cinasas Raf-1, MEK2 y ERK2 resultó ser esencial para que esta forma de muerte celular programada se lleve a cabo, lo cual desemboca en la fosforilación del receptor nuclear NR4A1 (ver figura 3) (Castro-Obregon, Rao et al. 2004). El papel crucial de NR4A1 en este tipo de muerte se comprobó al utilizar proteínas dominantes negativas para NR4A1, o bien por interferencia de RNA, lo cual resultó en inhibición de la muerte celular (Castro-Obregon, Rao et al. 2004). Por otro lado, si se inhibe la maquinaria basal de autofagia, se evita la muerte celular. Esto sugiere que NR4A1 modula la muerte autofágica mediada por NK₁R.

Otros dos modelos para inducir muerte autofágica, la sobre-expresión del receptor del factor de crecimiento tipo insulina (IGF1R) (ver figura 4) en células humanas HEK293, o bien la inhibición de caspasas en fibroblastos de ratón L929 (ver figura 5), también dependen de la actividad de NR4A1 (Zárraga, et. al, sometido). Por tanto, NR4A1 parece ser un modulador general de la autofagia.

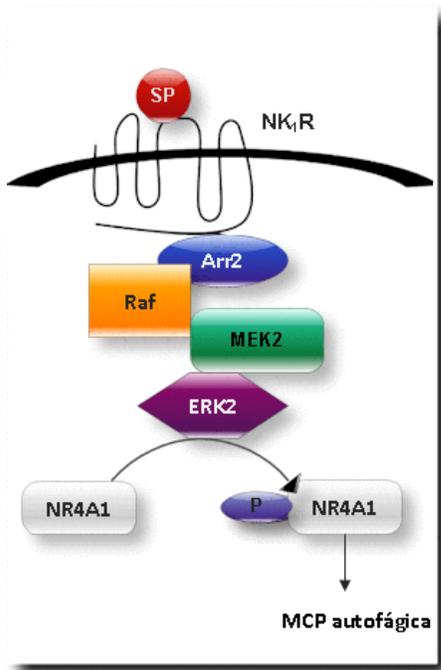


Figura 3. Muerte celular autofágica mediada por la interacción entre el receptor de neuroquininas 1 y su ligando, la sustancia P.

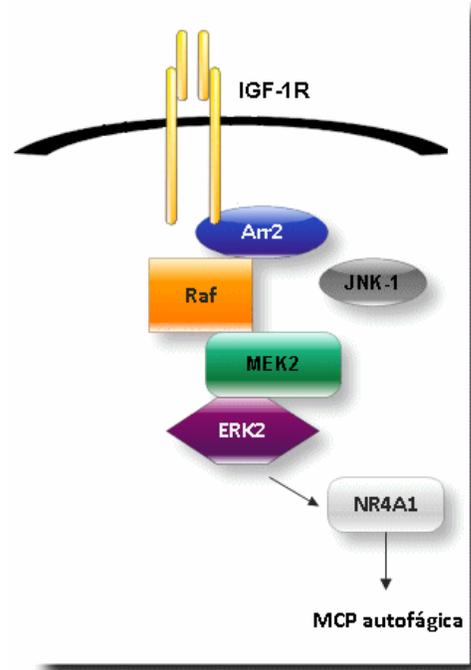


Figura 4. Muerte celular autofágica inducida por la sobre-expresión del receptor al factor de crecimiento tipo insulina.

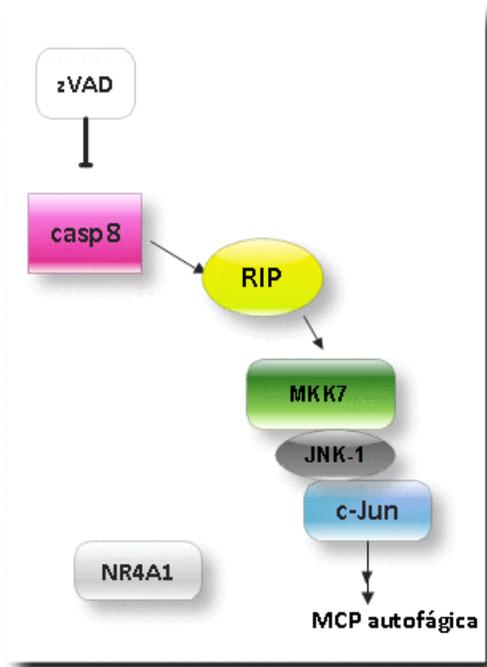


Figura 5. Muerte celular autofágica inducida por la inactivación de caspasas. Ver texto.

El receptor nuclear NR4A1 media la muerte autofágica.

El receptor nuclear NR4A1 (también conocido como TR3, NGFI-B o Nur77 entre otros nombres) es un receptor perteneciente a la súper familia de receptores nucleares de hormonas tiroideas. NR4A1 es una proteína requerida no sólo para la proliferación y diferenciación celular, sino también para apoptosis y de acuerdo a nuestros resultados, autofagia. La expresión de NR4A1 se incrementa por señales diversas, como pérdida de polaridad en la membrana o presencia del factor de crecimiento nervioso (Suzuki, Suzuki et al. 2003).

NR4A1 funciona como un factor de transcripción que regula la expresión genética, ya sea de manera positiva o negativa (Kastner, Mark et al. 1995). Actúa como activador de la transcripción al unirse al DNA como monómero al elemento NBRE, o como dímero al elemento NuRE. No se conoce su ligando, y se cree que NR4A1 regula la transcripción independientemente de la unión de ligando, ya que la expresión de la proteína de NR4A1 es suficiente para activar la transcripción de genes reporteros dependientes de NR4A1 (Philips, Lesage et al. 1997).

A pesar de que se han identificado secuencias a las cuales se une NR4A1, y la acumulación de evidencia de que NR4A1 funciona como un mediador de respuestas biológicas a estímulos extracelulares, se han identificado muy pocos genes que son blancos directos de NR4A1. Entre ellos, se encuentra el gen de la pro-opiomelanocortina pituitaria, cuyo promotor contiene un elemento de respuesta a Nur (NurRE) que une a homodímeros de NR4A1 (Philips, Maira et al. 1997) y los genes G6pc, Fbp1, Fbp2 y Eno3, relacionados con el metabolismo de la glucosa y que poseen un elemento de respuesta a Nur (Pei, Waki et al. 2006). Un análisis de microarreglos proporcionó una lista de 91 genes que fueron inducidos durante la muerte autofágica. Por medio de un ensayo bioinformático se determinó que 3 de los 91 genes analizados presentan un elemento de respuesta a NR4A1, dichos genes son: GFER (factor de crecimiento parecido a *erv1* aumentador de la regeneración de hígado), SFRS10 (homólogo humano del gen *transformer-2* de *Drosophila*, que funciona como un factor de empalme, y su sobreexpresión resulta en un incremento de la actividad de p53) y ZNF146 (cuyo producto, la proteína OZF, se encuentra sobreexpresada en cáncer pancreático y de colon) (Di Fonzo, Ronchi et al. 2009) (Huang 2003) (Ferbis, Bovin et al. 2003). Se desconoce al momento si alguno de estos genes blanco de NR4A1 participan en la muerte autofágica.

NR4A1 es capaz de formar heterodímeros con el receptor de retinoide X (RXR), el cual puede ser activado por ligandos de RXR y unirse al elemento de respuesta de RA (RARE) en el promotor del receptor de ácido retinóico b (RARb)(Wu, Zhang et al. 1997). NR4A1 también puede heterodimerizarse con el receptor huérfano COUP-TF para regular la expresión de RARb (Wu, Zhang et al. 1997). Ya que RARb tiene un papel clave en el crecimiento, supervivencia, diferenciación y apoptosis de varios tipos celulares (Moll, Marchenko et al. 2006), la regulación de la expresión de RARb puede dar cuenta de diversas actividades biológicas de los miembros de la familia NR4A.

NR4A1 participa en la inducción de muerte celular apoptótica en diferentes tipos celulares, por ejemplo, durante la selección negativa de células T (Winoto and Littman 2002). Además, en macrófagos induce muerte celular independiente de caspasas asociada a autofagia (Kim 2003) (Xu, Kim et al. 2006), lo que resulta relevante para nuestro trabajo.

En cuanto a su estructura, NR4A1 posee un dominio de transactivación en el extremo amino terminal, un dominio de unión a DNA con motivos de dedos de zinc (donde también se encuentra una señal de localización nuclear) y un dominio de unión a ligando, además de señales de exporte nuclear en su extremo carboxilo terminal (ver figura 6).

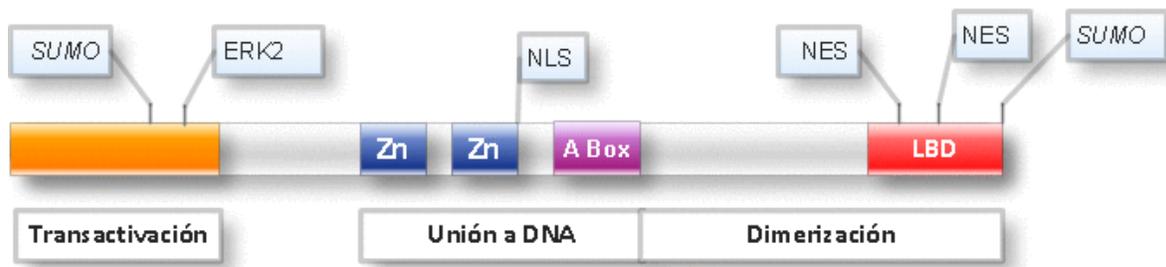


Figura 6. Esquema de la estructura de NR4A1. Los títulos en cursivas señalan modificaciones postraduccionales, propuestas por G. Zárraga de nuestro grupo, para NR4A1 (sumoilación de las lisinas 102 y 577).

Recientemente, se ha reportado que NR4A1, junto con otros miembros de la subfamilia NR4A (Nurr1 y NOR1) tiene un papel importante en la homeostasis de la glucosa. La expresión en el hígado de estos receptores es inducida potentemente por cAMP *in vitro*, y por glucagón y ayuno *in vivo* (Pei, Waki et al. 2006). En ratones, la expresión de NR4A1 introducido por medio de adenovirus induce genes involucrados en gluconeogénesis, estimulando la producción de glucosa y elevando los niveles de azúcar en sangre (Pei, Waki et al. 2006). También se ha observado que NR4A1 es un regulador positivo de los genes G6pc, Fbp1, Fbp2 y Eno3, que aumentan la glucosa disponible para exportación desde el hígado. G6pc, Fbp1, Fbp2 codifican para enzimas clave de la ruta de la gluconeogénesis, lo cual puede dirigir el flujo metabólico de la glucosa hacia su síntesis. Este es un proceso endergónico, por lo que su incremento podría disminuir los niveles de ATP.

En adipocitos 3T3-L1, la sobre expresión de NOR1 aumenta el transporte de glucosa incrementado por insulina. Es posible que dicho aumento en la sensibilidad de la insulina se deba al incremento del nivel de glucosa en la sangre (Fu, Luo et al. 2007). Estos hallazgos sugieren que los receptores nucleares miembros de la subfamilia NR4A son blancos potenciales para el tratamiento de enfermedades metabólicas.

Además, se ha observado que NR4A1 también induce la expresión del gen que codifica para el transportador de glucosa Glut2, el cual contribuye al exporte de glucosa del interior de la célula al torrente sanguíneo (Shepherd and Kahn 1999).

A pesar de que no se ha identificado un ligando fisiológico para NR4A1, el octacétido citosporona B (Csn-B) ha sido identificado como un agonista natural de NR4A1 (Zhan, Du et al. 2008). Csn-B, aislado del hongo *Dothiorella sp.* tiene una fuerte afinidad por NR4A1 y estimula la actividad transcripcional de dicho receptor nuclear; Csn-B también potencia la gluconeogénesis en el hígado de ratón, acompañada de la inducción de múltiples genes involucrados en la gluconeogénesis (Zhan, Du et al. 2008).

Es importante resaltar que NR4A1 posee otros papeles independientes de su actividad transcripcional. Bajo estímulos específicos de muerte (como la adición de drogas inductoras de apoptosis), NR4A1 es capaz de salir de núcleo y trasladarse a la mitocondria, donde promueve la apoptosis por medio de la interacción de su dominio de unión a ligando con la proteína Bcl-2 (Lin, Kolluri et al. 2004) (mencionado más adelante). En células de algunas líneas tumorales, NR4A1 se transloca al retículo endoplásmico en respuesta a CD437, donde interactúa con Bcl-2, liberando Ca^{2+} de las pozas, lo cual desemboca en apoptosis a través de la activación de caspasa 4 específica del retículo endoplásmico (Liang, Song et al. 2007). Notoriamente, Csn-B incrementa la inducción de apoptosis mediada por NR4A1, aumentando la inhibición de tumores exógenos transplantados a ratones desnudos (cuyo sistema inmune está inhibido) por translocación de NR4A1 a la mitocondria, ocasionando liberación de citocromo c. Dichos efectos no fueron observados en ratones ni células sin NR4A1, mostrando el papel crucial de NR4A1 en dichos procesos (Zhan, Du et al. 2008), y sugiriendo que la comprensión de los mecanismos biológicos en los que está involucrado podría resultar en el desarrollo de nuevas terapias para tratar padecimientos como el cáncer, diabetes o la hipoglicemia. NR4A1 también es capaz de interactuar directamente con p53 en el citosol, confiriéndole mayor estabilidad a dicha proteína (Zhao, Chen et al. 2006) (figura 7).

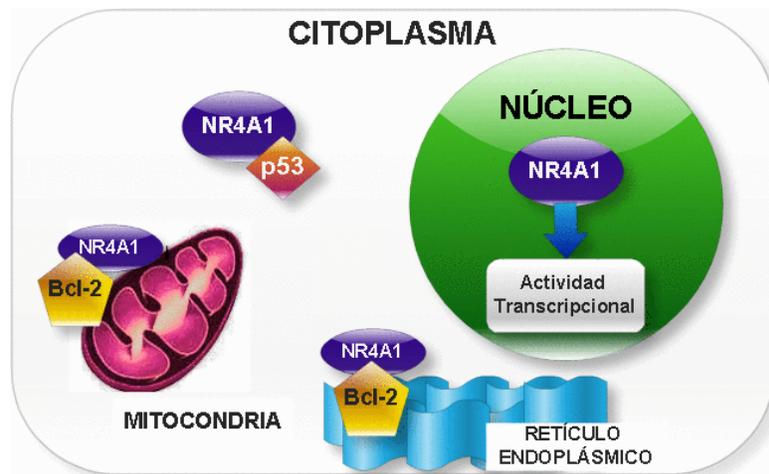


Figura 7. Diferentes papeles de NR4A1 en la célula. NR4A1 puede funcionar como un factor transcripcional en el núcleo; sin embargo, también es capaz de salir del núcleo y actuar en la mitocondria o en el citoplasma, regulando la actividad de otras proteínas por medio de su interacción directa con ellas. También se ha observado en el retículo endoplásmico.

Proteínas relacionadas con la regulación de la autofagia que podrían ser moduladas por NR4A1

p53

La proteína p53 es la proteína supresora de tumores mejor caracterizada hasta ahora. Se encuentra mutada en alrededor del 55% de los cánceres humanos (Vousden and Lane 2007). Entre algunas de las funciones que se ha descubierto que controla, se encuentran: la defensa anti-oxidante, el metabolismo, la estabilidad genómica, la proliferación, la senescencia replicativa y la muerte celular (Vousden and Lane 2007). Su función es crucial para la prevención del desarrollo de tumores.

p53 es capaz de iniciar una retención del ciclo celular y desencadenar la muerte celular apoptótica en respuesta a terapias anti cáncer (Vousden 2000). La reexpresión de p53 en células cancerosas deficientes de dicha proteína resulta en la regresión de tumores a través de la reactivación de procesos como la apoptosis y la senescencia, ambas medidas de protección contra la oncogénesis (Amaravadi et al, 2007).

La proteína p53 ejerce un papel pro-apoptótico directo en la mitocondria, al involucrarse en interacciones de proteína-proteína con miembros pro y anti apoptóticos de la familia Bcl-2. Se han encontrado semejanzas funcionales entre p53 y NR4A1, ya que este último también ejerce actividades biológicas opuestas de supervivencia o muerte (Moll, Marchenko et al. 2006). En células cancerosas, NR4A1 funciona como un factor de supervivencia en el núcleo; en contraste, activa la muerte cuando ciertos estímulos inducen su migración a la mitocondria, donde interactúa con la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la modifica conformacionalmente, ocasionando que esta Bcl-2 modificada provoque la liberación de citocromo c, y por lo tanto, apoptosis (Moll, Marchenko et al. 2006). Esto señala a dichos mecanismos mitocondriales tanto de p53 como de NR4A1 como posibles blancos para terapias anti cáncer. Los factores que interactúan con p53 para inducir apoptosis pertenecen a la familia de proteínas Bcl-2, los cuales también regulan la autofagia. En levadura y células de mamífero, la interacción de Bcl-2 con la proteína de Beclin-1 inhibe la autofagia (Pattingre, Tassa et al. 2005).

Además de sus semejanzas en cuanto a mecanismos de acción, la unión de NR4A1 a la proteína p53 obstruye la ubiquitinación de esta última, inducida por la proteína MDM2, que resultaría en la degradación de p53 (Zhao, Chen et al. 2006). Así, la unión de NR4A1 a p53 le confiere estabilidad a dicha proteína supresora de tumores, que de otra forma se degradaría para mantenerse en niveles celulares bajos.

La disminución de los niveles de p53 es requerida para la inducción de la autofagia; varios inductores de la autofagia ocasionan la degradación de p53, mientras que la inhibición de la degradación de p53 citoplásmico evita la autofagia, inhibiendo a AMPK y activando a mTOR. Esto

muestra que p53 inhibe la autofagia mediante un efecto citoplásmico, no nuclear (Tasdemir, Maiuri et al. 2008).

Es interesante resaltar que dicho mecanismo de inhibición, supresión o decremento de p53 como forma de inducción de autofagia, se encuentra conservado evolutivamente, pues se ha observado en células humanas, de ratón y de nemátodo (Tasdemir, Maiuri et al. 2008). Dicho mecanismo también se ha observado en células cancerosas (Chiara, Malik et al. 2009).

En contraste, el daño causado por la quimioterapia, radiación ultravioleta, radiación ionizante y otros agentes que alteran la estructura del DNA activan a p53, así como otras condiciones de estrés que provocan la formación de especies reactivas de oxígeno. Se ha observado que el daño al DNA induce autofagia dependiente de p53 (Feng, Zhang et al. 2005).

La inducción de autofagia por p53 ha sido vinculada con la inhibición de mTOR (Feng, Zhang et al. 2005), mientras que la inhibición de la autofagia por p53 se encuentra correlacionada con la estimulación de la actividad de mTOR. Es posible, entonces, que p53 controle la autofagia a través de la ruta dependiente de AMPK/mTOR (figura 2). Además, aparentemente la inducción de autofagia por p53 depende de la transcripción de genes como DRAM (ver más adelante) (Crighton, Wilkinson et al. 2006), mientras que la inhibición es un efecto citoplásmico (Tasdemir, Maiuri et al. 2008). La localización del núcleo al citoplasma de p53 es regulado por modificaciones post-traduccionales o señales de exportación nuclear, y tiene un papel importante en la autofagia.

Dado que p53 es capaz de regular la autofagia modulando la actividad de mTOR (Moll, Marchenko et al. 2006) y que p53 es capaz de interactuar directamente con el receptor nuclear NR4A1 durante la muerte autofágica (figura 8), es posible que NR4A1 module la autofagia (y la actividad de mTOR) a través de p53.

DRAM

DRAM (damage-regulated autophagy modulator, o modulador de autofagia regulado por daño), es un gen blanco de la proteína p53, necesario para la inducción de autofagia por medio de p53 (Crighton, Wilkinson et al. 2006) y la muerte celular programada (Crighton, Wilkinson et al. 2007). DRAM es un gen que se encuentra mutado en ciertos tipos de cáncer, lo cual resalta la posibilidad de que la autofagia tenga un papel más importante y significativo en el desarrollo del cáncer del que se creía inicialmente (Crighton, Wilkinson et al. 2007).

Existe un alto grado de homología entre la proteína DRAM en humanos y la de ratón (97%) y rata (83%), así como otras especies. Análisis filogenéticos muestran un alto grado de conservación de DRAM a través de la evolución (Kerley-Hamilton, Pike et al. 2007).

DRAM es una proteína lisosomal que posee varios dominios transmembranales. Análisis de RT-PCR han identificado al menos una variante de empalme de DRAM, consistente en la eliminación de los

exones 4 y 5, lo cual resulta en la conservación del marco de lectura con una eliminación predicha del cuarto y quinto dominio transmembranal de DRAM. Se desconoce la consecuencia funcional de dicho empalme alternativo. (Kerley-Hamilton, Pike et al. 2007)

La disminución de DRAM ocasiona una respuesta subóptima tras la exposición a inductores de autofagia tan diversos como rapamicina, litio y tapsigargina, poniendo de relieve su papel como modulador positivo de la autofagia. Cabe destacar que la activación de p53 no se ha reportado como parte de la acción de dichos agentes inductores de autofagia, de modo que es probable que otros mecanismos independientes de p53 (traduccionales o postraduccionales) contribuyan a la modulación de los niveles de DRAM al emplear inductores de autofagia (Maiuri, Malik et al. 2009).

Dado que el receptor nuclear NR4A1 puede interactuar directamente con p53 (figura 8), que a su vez induce muerte autofágica, es posible que también lo haga por medio de la transcripción de DRAM.

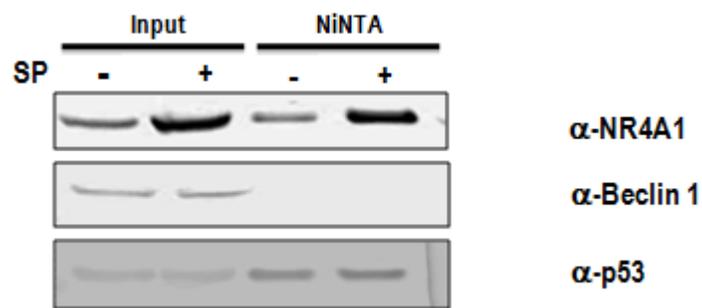


Figura 8. NR4A1 interactúa con p53, pero no con Beclin 1, durante la muerte celular autofágica. NR4A1 fue etiquetado con una cola de histidinas para poder purificarlo mediante una columna de Niquel. Se co-transfectó junto con NK₁R en células HEK293, se indujo muerte autofágica exponiendo las células a SP (+) o no (-), se purificó NR4A1 y se analizó por Western blot la asociación con Beclin 1 o p53. Se observa que NR4A1 es capaz de interactuar con p53 en el modelo de muerte autofágica de NK₁R/SP. NR4A1 no interactúa con Beclin 1, dejándolo libre para formar parte del complejo de formación de autofagosomas de la PI3K (datos no publicados).

JUSTIFICACIÓN.

La autofagia es un proceso catabólico que actúa como un mecanismo de regulación del crecimiento y muerte celular a lo largo de toda la vida del individuo. La pérdida de control en dichos procesos resulta en enfermedades como el cáncer o la diabetes, padecimientos que aquejan a la creciente población madura de todo el mundo, convirtiendo a la búsqueda de terapias efectivas para el tratamiento de dichas patologías en una prioridad para mejorar la calidad de vida de los pacientes. El entendimiento de los mecanismos que regulan la autofagia es crucial para combatir de manera más eficaz a dichas patologías.

La muerte celular autofágica es un tipo de muerte celular programada alternativa a la apoptosis, lo cual abre la posibilidad de ser utilizada como un modo de eliminar células cancerosas que se muestran resistentes al tratamiento por quimioterapia. La apoptosis es la forma de muerte celular inducida generalmente por las terapias para tratar el cáncer. Sin embargo, algunas de esas células cancerosas pueden tener dañada la maquinaria apoptótica (lo cual les impide poner en marcha este programa de muerte celular), de modo que el lanzamiento de una muerte independiente de la apoptosis, como lo es la muerte autofágica, se perfila como un novedoso e interesante recurso que podría ser utilizado para combatir estos casos de resistencia.

HIPÓTESIS

Puesto que NR4A1 participa en la muerte celular autofágica activada por tres estímulos diferentes, proponemos que es capaz de regular la magnitud de la autofagia modulando la actividad de otras proteínas como podría ser p53, resultando en activación de DRAM, o modulando el metabolismo de la glucosa de forma indirecta. La cinasa mTOR inhibe a la autofagia, promoviendo la glucólisis y la producción de ATP por medio de la fosforilación oxidativa. NR4A1, al inducir la expresión de genes que codifican para las enzimas cruciales de la gluconeogénesis, podría inhibir a la glucólisis, y por lo tanto, la producción de ATP, al tiempo que disminuye la concentración de glucosa en la célula por medio de la inducción de la expresión del transportador Glut2, que exporta la glucosa intracelular al torrente sanguíneo. Estas condiciones podrían inactivar a mTOR y favorecer la activación de la autofagia.

En resumen, la hipótesis consiste en que el receptor nuclear NR4A1 regula la autofagia en la célula por dos mecanismos:

- a) Por medio de la transcripción de genes que activan la gluconeogénesis, causando un desbalance metabólico que provoca una disminución de ATP, que lleva a la activación de AMPK y por consiguiente la inactivación de mTOR.
- b) Mediante interacción con p53, teniendo como consecuencia la inactivación de mTOR y la activación de DRAM.

OBJETIVOS.

1. Determinar si durante la muerte autofágica mediada por NR4A1 hay inhibición de la cinasa mTOR.

Meta específica:

- Detectar el estado de fosforilación del sustrato de mTOR, S6K, por medio de Western blot, durante el proceso de muerte autofágica.

2. Determinar si NR4A1 modula la muerte autofágica de manera indirecta, al provocar una caída en los niveles intracelulares de ATP, consecuencia de la inducción de genes gluconeogénicos fuera de contexto.

Metas específicas:

- Determinar si los niveles intracelulares de ATP disminuyen durante la muerte autofágica.
- Detectar el estado de fosforilación de AMPK por Western blot durante el proceso de muerte autofágica.

3. Determinar si hay inducción de la expresión de DRAM durante la muerte autofágica.

Meta específica:

- Determinar la aparición de DRAM por Western blot durante la muerte autofágica.

4. Determinar si la actividad transcripcional de NR4A1 es necesaria para la muerte celular autofágica.

Meta específica:

- Encontrar secuencias de DNA o RNA como potenciales aptámeros que inhiban específicamente la actividad transcripcional de NR4A1.

MATERIAL Y MÉTODOS.

CULTIVO DE CÉLULAS

MEDIOS Y SOLUCIONES

- **Medio DMEM (Dubelco's modified Eagle Medium) (GIBCO #12100-046)**

<i>Para 1 litro:</i> <ul style="list-style-type: none">▪ 1 sobre de medio en polvo▪ 3.7 g de NaHCO₃▪ Agua grado cultivo	<i>PREPARACIÓN:</i> <ol style="list-style-type: none">1. Disolver el medio en polvo en 800 ml. de agua grado cultivo, mediante agitación suave.2. Añadir 3.7 g de NaHCO₃ y agitar hasta disolver.3. Ajustar el pH a 6.9 por adición de HCl 1N.4. En campana, aforar a 1 litro y esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.5. Almacenar a 4° C y utilizar en un periodo máximo de 2 meses.
--	---

- **Medio DMEM suplementado (para HEK293T).**

Para 250 ml:

- 200 ml. de DMEM
- 25 ml. de FBS (final 10%)
- 2.5 ml. de GPS 100X (final 1X)
- 2.5 ml. de piruvato de sodio 100 mM (final 1mM).

- **PBS 1X**

<i>Para 1 litro:</i> <ul style="list-style-type: none">▪ 8 g. de NaCl▪ 0.2 g de KCl▪ 1.44 g de Na₂HPO₄▪ 0.24 g de KH₂PO₄▪ Agua grado cultivo	<i>PREPARACIÓN:</i> <ol style="list-style-type: none">1. Disolver y esterilizar en campana por medio de filtración a través de una membrana de 0.22 µm.
--	---

- **Tripsina 0.25%**

Para 10 ml:

- 1 ml. de tripsina 2.5% en agua grado cultivo (almacenada a -20°C)
- 9 ml. de verseno

➤ **Descongelamiento de células.**

PROCEDIMIENTO:

1. Incubar el criovial por 1 a 2 minutos en el baño de agua a 37° C.
2. Agregar 1 ml. de medio suplementado DMEM fresco y transferir el contenido a un tubo de 15 ml. (Corning #430790).
3. Aforar a 5 ml. con medio DMEM suplementado, previamente calentado a 37° C.
4. Agitar suavemente por pipeteo.
5. Centrifugar por 4 minutos a 220 x g.
6. Aspirar el sobrenadante con la bomba de vacío y resuspender en 10 ml. de medio DMEM suplementado.
7. Sembrar en un plato de cultivo de 10 cm.
8. Cambiar el medio por fresco al día siguiente.

➤ **Cultivo de células HEK293T.**

PROCEDIMIENTO:

Se utilizó la línea celular HEK293T proveniente de células endoteliales de riñón de embrión humano.

1. Aspirar el medio utilizando la bomba de vacío.
2. Lavar con 3 ml. de PBS, deslizándolo por la pared de la caja e inclinando la caja suavemente para bañar las células.
3. Aspirar.
4. Añadir 1 ml. de tripsina 0.25% a cada caja de 10 cm. (Corning #430167).
5. Mover el plato para cubrir bien la caja con la tripsina.
6. Incubar a 37° por 3 minutos.
7. Agregar 4 ml. de medio de crecimiento, bañando bien las células, para inactivar la tripsina. Dispersar las células con un pipeteo suave.
8. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml. (Corning #430790).
9. Centrifugar 4 minutos a 220 x g.
10. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
11. Resuspender el botón en 10 ml. de medio.
12. Cuantificar densidad y viabilidad celular: tomar una alícuota de 10 µl. y colocarla en la cámara de Neubauer, para llevar a cabo el conteo de células por campo (a razón de 1 µl. por campo).

13. Sembrar una densidad celular de acuerdo con el propósito:

- Mantener la línea:

1 x 10⁶ en 10 ml. de medio por caja de 10 cm.

- Transfecciones transitorias:

3.5 x 10⁵ células en 2 ml. de medio en caja de 6 pozos. (Costar #3506)

TRANSFECCIÓN TRANSITORIA POR CaCl₂.

Soluciones requeridas:

HBS 2X.

Para 100 ml:

- NaCl 273 mM (1.6 g)
- KCl 9.9 mM (0.074 g)
- Na₂HPO₄ 2.8 mM (0.04 g)
- Dextrosa 11 mM (0.2 g)
- HEPES 41 mM (1 g)

PREPARACIÓN:

1. Disolver y esterilizar en campana por medio de filtración a través de una membrana de 0.22 µm.
2. Disolver en 95 ml. de agua grado cultivo.
3. Preparar tres soluciones, cada una ajustada a un pH distinto: 6.9; 7.0; 7.1.
4. En campana, filtrar las soluciones a través de una membrana de 0.22 µm.
5. Determinar el buffer con mejor eficiencia (mínimo 70%), transfectando un vector de expresión de GFP, con los diferentes buffer de HBS a distintos pH.
6. Alicuotar el buffer que dé lugar a la mejor eficiencia de transfección, cada 500 µl, y almacenarlo a -70°C.

CaCl₂ 2M (5 ml.)

- 1.472 g de CaCl₂

1. Aforar a 5 ml. con agua grado cultivo, en campana, filtrarlo a través de una membrana de 0.22 µm.
2. Alicuotar cada 500 µl.
3. Almacenar a 4°C.

➤ **Transfección transitoria por CaCl₂.**

PROCEDIMIENTO:

1. Sembrar **previamente a la transfección**, 24 horas antes del experimento, el número correspondiente de células (3.5×10^5 células en 2 ml. de medio por pozo de 35 mm).
2. Una vez transcurridas las 24 horas, reducir el volumen del medio de cultivo a la mitad.
3. En un tubo eppendorf de 1.5 ml., mezclar para cada muestra:

Plato de 35 mm - 1 plásmido:

Agua grado cultivo	ADN (1 µg/µl)
38.75 µl	5 µg

4. Mezclar perfectamente, resuspendiendo con la pipeta.
5. Añadir:

CaCl₂ 2M
6.25 µl

6. Resuspender muy suavemente, un par de veces.
7. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregar, resuspendiendo muy suavemente una sola vez:

HBS 2X
50 µl

Volumen total:
100 µl

9. Incubar inmediatamente por 2 minutos a 37 °C, en un baño de agua.
10. Agregar la mezcla al cultivo, por goteo, y agitar delicadamente el cultivo para dispersar la mezcla.
11. Incubar a 37 °C y 5% de CO₂, en humedad.
12. Cambiar la solución de transfección por medio fresco dentro de las 12 a 15 horas posteriores a la transfección.

MODELO DE MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA INDUCIDA POR SP/NK₁R.

Día 1. 1. Sembrar células HEK293T en cajas de 6 pozos, a razón de 3.5×10^5 células en 2 ml. de medio por pozo de 35 mm.

Día 2. 2. Realizar transfección transitoria con CaCl₂, con las siguientes condiciones:

Condición	Número de pozos
Células sin transfección (no se agrega plásmido)	2
NK ₁ R	4
pcDNA3.1 (vector sin NK ₁ R)	4

3. Incubar a 37°C y 5% de CO₂ en humedad.

Día 3. 4. Entre 12 y 15 horas después de la transfección, aspirar el medio y agregar a cada pozo 1 ml. de medio fresco, precalentado a 37°C.

5. A las 24 horas posteriores a la transfección, agregar sustancia P, a una concentración final 100 nM.

La sustancia P debe prepararse al momento, ya que su tiempo de vida media a temperatura ambiente es de unos cuantos minutos, por lo cual debe sacarse del congelador en el momento en que va utilizarse, y mantenerse en hielo hasta el instante en que se utilice.

La sustancia P debe prepararse a una concentración de 2X en 1 ml (por pozo), para que al agregar al medio que contiene cada pozo la concentración final sea la adecuada (1X).

6. Ya que la sustancia P utilizada se encuentra a una concentración 100 µM, se realiza una dilución de 1:1000

Medio (por pozo)	Sustancia P [100 µM]
1 ml.	2 µl.

7. Mezclar en un tubo de 15 ml las cantidades correspondientes de medio fresco y SP, de acuerdo a la cantidad de pozos.

8. Resuspender suavemente y agregar **de inmediato** a los pozos correspondientes (1 ml por pozo), escurriendo el líquido por la pared.

9. Agitar ligeramente la caja, inmediatamente después de agregar el medio con sustancia P, para distribuirlo homogéneamente.

10. Al control, sólo se agrega 1 ml. de medio fresco por pozo, junto con la cantidad de agua equivalente a la sustancia P agregada a los demás pozos.

Día 4.

A las 24 horas de la inducción de muerte celular, aproximadamente, se lleva a cabo la cuantificación de viabilidad celular por exclusión de azul de tripano:

11. Agitar las cajas ligeramente, para desprender las células muertas que se encuentren aún adheridas parcialmente.
12. Tomar el medio de cada pozo y colocarlo en un tubo eppendorf.
13. Centrifugar por 5 minutos a 300 rpm.
14. Quitar con cuidado el sobrenadante, usando la bomba de vacío. Se recomienda eliminar primero las burbujas que se hayan formado, y posicionar el tubo de manera que la punta de la bomba de vacío no pueda tocar la pastilla, pues esta última es muy frágil.
15. Resuspender en 50 μ l de azul de tripano (solución al 10% en PBS).
16. Cargar 10 μ l de solución en la cámara de Neubauer, y contar las células teñidas de azul, que son las que se encuentran muertas.
17. Resuspender al realizar cada pipeteo.

La reactividad del azul de tripano se basa en el hecho de que el cromóforo del colorante se encuentra cargado negativamente, y no interactúa con una célula a menos que su membrana esté dañada. Las células vivas y con la membrana intacta excluyen el colorante.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DE CÉLULAS ADHERENTES.**Soluciones.***Buffer de lisis*

- Tris 50 mM, pH8
- NaCl 150 mM
- 1% NP-40 o Igepal
- 0.5% Deoxicolato de sodio
- 0.1% SDS

Para 50 ml:

- 7.5 ml de NaCl 1M
- 500 μ l Igepal o NP-40
- 2.5 ml de Deoxicolato de sodio 10%
- 500 μ l de SDS 10%
- 5 ml de Tris 500 mM, pH 8

Para 1 ml:

- 150 μ l de NaCl 1M
- 10 μ l Igepal o NP-40
- 50 μ l de Deoxicolato de sodio 10%
- 10 μ l de SDS 10%
- 100 μ l de Tris 500 mM, pH 8

Antes de usar, adicionar la cantidad correspondiente de solución stock 10X de inhibidores de proteasas (Mini-complete, Roche # 11 836 153 001) y fosfatasas (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche # 04906837001).

Solución de Bradford (Bio Rad #500 0006)

Se usa en proporción 1:4

Se prepara al instante.

PBS 1X

PROCEDIMIENTO:

- Día 1.** 1. Cultivar 3.5×10^5 células en cajas de cultivo de 35 mm con 2 ml de medio.
- Día 2.** 2. Transfectar a las células con el plásmido de interés, como se indicó anteriormente.
- Día 4.** 3. Hacer la lisis celular a las 48 horas posteriores a la transfección, para permitir una mayor producción de la proteína a detectar, para lo cual se despegan las células con un raspador (sin retirar el medio de cultivo, ya que en él puede haber células flotando que contengan la proteína de interés), transfiriéndolas a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Es importante que desde este momento todo se haga en frío, para evitar la degradación de las proteínas.

1. Centrifugar por 5 minutos a 358 g a 4°C (rotor F2402), para separar las células del medio de cultivo.
2. Tirar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de PBS frío.
3. Centrifugar nuevamente por 5 minutos a 358 g a 4°C (rotor F2402), para eliminar los restos de medio de cultivo.
4. Tirar el sobrenadante y de nuevo resuspender las células en 1 ml de PBS frío. Centrifugar por 5 minutos a 358 g a 4°C (rotor F2402).
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 50µl de buffer de lisis (o ajustar la cantidad de buffer de lisis de modo que sea semejante al volumen de la pastilla) e incubar 20 minutos en hielo. Trascorridos los 20 minutos, sonicar con 3 pulsos de 20 segundos a amplitud 1 (Minisonix, sonicator, Ultrasonic processor; modelo S3000) para fragmentar las estructuras celulares no lisadas por el buffer, sobre todo el DNA.

6. Centrifugar 10 minutos a 17,530 g a 4°C, recuperar el sobrenadante y cuantificar la cantidad de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
7. Preparar una curva estándar y el análisis de las muestras de acuerdo a la siguiente tabla:

Curva estándar

Solución de Bradford 1:4 (μl)	Agua (μl)	Buffer de lisis (μl)	BSA [$1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$] (μl)
990	7	3	0
990	5	3	2
990	3	3	4
990	1	3	6

Análisis de muestras

Muestras	Solución de Bradford 1:4 (μl)	Agua (μl)	Extracto de proteína (μl)
1	990	7	3
2	990	7	3
3	990	7	3
n	990	7	3

8. Medir la absorbancia tanto de la curva estándar como de las muestras. A partir de los datos de la curva estándar, hacer una regresión lineal y obtener valores de la ecuación de la recta ($y = mx + b$, donde $x =$ proteína y $y =$ absorbancia), para extrapolarlos y determinar la concentración de proteína en los extractos.
9. Alicuotar los extractos, de manera que haya 20 μg por alícuota y almacenar a -70°C hasta su uso, para evitar la degradación de proteína.

WESTERN BLOT

Soluciones

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

- Tris base 1.5 M (27.23 g)
- 80 ml agua bidestilada

Llevar a pH 8.8 con HCl 6 N.

Aforar a 150 ml.

Almacenar a 4°C.

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

- Tris base 0.5 M (6 g)
- 60 ml de agua bidestilada

Llevar a pH 6.8 con HCl 6 N.

Aforar a 100 ml.

Almacenar a 4°C.

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

- 100 mg de APS
- 1 ml de agua bidestilada

A 4°C puede almacenarse hasta 3 semanas.

Buffer de corrida 10X pH 8.3 (1 L)

- Tris base 25 mM (30.3 g)
- Glicina 192 mM (144 g)
- SDS 0.1% (10 g)

Aforar a 1 L con agua bidestilada.

Se usa 1X.

Almacenar a 4°C.

Buffer de carga 3X (9.5 ml)

- 3.55 ml de agua bidestilada
- 1.25 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8
- 2.5 ml de glicerol
- 2 ml de SDS 10%
- 200 µg de azul de bromofenol 0.5%

Alicuotar cada 500 µl por tubo.

Se usa 1X final.

Almacenar a 4°C.

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

Buffer de transferencia (1 L)

- Glicina 39 mM (2.9 g)
- Tris base 48 mM (5.8 g)
- SDS 0.037% (0.37 g)
- Metanol 20% (200 ml)

Se prepara al momento, para evitar evaporación.

Preenfriar a 4°C.

Rojo de Ponceau (40 ml)

- Rojo de Ponceau 0.1% (40 mg)
- Ácido acético 5% (2 ml)

Se almacena en oscuridad.

TBS 10X (1 L)

- Tris-HCl 200 mM, pH 7.5 (24.22 g)
- NaCl 1.5 M (87.66g)

Aforar a 1 L con agua bidestilada.

Almacenar a 4°C.

TBST (1 L)

- 100 ml TBS 10X
- Tween 20 0.01% (1 ml)

Aforar a 1 L con agua bidestilada.

Almacenar a temperatura ambiente hasta 3 meses.

Leche 5% (50 ml)

- 2.5 g de leche Carnation sin grasa

Diluirlo en 50 ml de TBST.

Se prepara al momento, para evitar su contaminación por microorganismos.

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

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

1. Preparar el gel desnaturante de acuerdo a la siguiente tabla:

Proporciones para geles desnaturantes

Gel separador

Soluciones	8% (9ml)	10% (9ml)	12% (9 ml)
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.385 ml	2.385 ml	2.385 ml
Agua	4.185 ml	3.58 ml	2.987 ml
SDS 10%	90 μ l	90 μ l	90 μ l
A/B 30%	2.393 ml	3 ml	4.488 ml
APS 10%	72 μ l	72 μ l	72 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l

Gel concentrador 5% (3 ml)

Soluciones	
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	750 μ l
Agua	1.697 ml
SDS 10%	30 μ l
A/B 30%	498 μ l
APS 10%	22.5 μ l
TEMED	3 μ l

2. Mezclar las soluciones para el gel separador de acuerdo a las proporciones indicadas y verter la mezcla al cassette para geles de poliacrilamida. Agregar 500 μ l de alcohol isobutílico sobre el gel, para alinearlos, y dejar polimerizar. Dejar una muestra de la mezcla de acrilamida en el tubo de 50 ml (Corning # 430828) donde se preparó, para comprobar la polimerización (toma 20 minutos, aproximadamente).
3. Una vez polimerizado el gel, drenar el alcohol isobutílico, y preparar ahora el gel concentrador de acuerdo a las proporciones indicadas en la tabla anterior.
4. Con una micropipeta, verter el gel concentrador poco a poco sobre el gel separador, hasta casi llenar el cassette, y colocar el peine con cuidado de que no se formen burbujas. Esperar aproximadamente 15 minutos a que polimerice, de la misma manera que con el gel separador, dejar una muestra de la mezcla en el tubo donde se preparó, para comprobar la polimerización.

Una vez con el gel concentrador, los geles pueden almacenarse en humedad y a 4°C hasta una semana.

5. Preparar las muestras y el marcador de peso molecular de proteínas, mezclándolas con buffer de carga. Es recomendable cargar 30 µg por muestra de proteína, para una mejor detección.
6. Ya preparadas las muestras, se incuban por 3 minutos a 95°C.
7. Llenar la cámara de electroforesis con buffer de corrida.
8. Cargar las muestras y el marcador de proteínas (Page Ruler Fermentas # SM0671 ó Dual Color, BioRad # 161 0374) en el gel. Los carriles libres de muestra deben ser cargados con buffer de carga, y todos los carriles deben tener el mismo volumen.
9. Correr el gel a 130 V, hasta que el frente de corrida, indicado por el azul de bromofenol del buffer de carga llegue al final del gel. Toma aproximadamente 2 horas.

b) Transferencia de proteínas de gel de poliacrilamida a membrana de PVDF

Correr el SDS-PAGE.

1. Cortar la membrana de PVDF (Inmobillion-P, Millipore # IPVH00010) del tamaño exacto del gel y prehumedecerla en metanol al 100% para activarla.

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

2. Prehumedecer esponjas y papeles Wathman (Bio Rad # 1703932) en buffer de transferencia frío, a saturación; de la misma manera, equilibrar el gel y la membrana activada en buffer de transferencia frío.
3. Armar un sándwich dentro de buffer de transferencia de la siguiente manera: esponja, 2 papeles Wathman, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, 2 papeles Wathman, esponja.
4. Presionar el sándwich de manera que se eliminen las burbujas formadas y colocar en la cámara de transferencia. El gel debe quedar orientado hacia el ánodo y la membrana de PVDF hacia el cátodo.
5. Llenar la cámara de transferencia con buffer de transferencia y correr durante 90 minutos a 100 V a temperatura ambiente. Puede recurrirse a la transferencia en frío durante toda la noche a 14 V, cuando hay poca proteína.

La membrana puede ser teñida con rojo de Ponceau al 0.1%, durante 5 minutos, para corroborar la correcta transferencia de proteínas, o bloquearse directamente con leche sin grasa al 5%.

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

c) Detección de proteínas por medio de Western Blot (Revelado en equipo Odyssey)

Al terminar la transferencia de proteínas a la membrana de PVDF, remojar la membrana en PBS durante varios minutos.

Colocar la membrana en una solución de leche en polvo sin grasa al 5%, disuelta en TBST, y bloquear por una hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C.

Enjuagar 3 veces, por 10 minutos cada vez, en TBST (mas un enjuague inicial), en agitación suave.

Diluir el anticuerpo primario en TBST, e incubar la membrana con el anticuerpo primario durante dos horas (monoclonal), o una hora (policlonal), a temperatura ambiente y en agitación suave. La incubación también puede llevarse a cabo *overnight* a 4°C, dependiendo de las especificaciones de la hoja técnica del anticuerpo.

Lavar la membrana con TBST, 4 veces, 5 minutos por vez, en agitación suave, usando volúmenes grandes de TBST.

Diluir el anticuerpo secundario correspondiente (Odyssey anti-mouse 700, u Odyssey anti-rabbit 700/800) en TBST. Se ha encontrado que la dilución más eficaz para la detección de proteínas es de 1:15000 para el anticuerpo anti-mouse 700, y 1:12000 para anti-rabbit 800.

Incubar la membrana, protegiéndola de la luz, de 30 a 60 minutos, en agitación suave. Dejar la membrana incubándose por periodos de más de una hora no se recomienda, ya que incrementa el ruido de fondo y el pegado inespecífico del anticuerpo. En general se ha logrado una detección eficaz con 45 minutos de incubación.

Lavar la membrana 4 veces, 5 minutos por cada lavado, con TBST, en agitación suave y protegiendo a la membrana de la luz.

Enjuagar la membrana con PBS para eliminar el TBST residual, y escanear en el canal correspondiente, de acuerdo al fluoróforo acoplado al anticuerpo secundario utilizado.

MEDICIÓN DE NIVELES DE ATP EN CÉLULAS HEK293T EN CONDICIONES DE MUERTE AUTOFÁGICA

Día 1:

1. Cultivo de células HEK293T, en cajas de 6 pozos, con 3.5×10^5 células en 2 ml de medio por pozo.

Día 2:

2. Transfección de las células HEK293T, con pcDNA3.1 o NK₁R.

Día 3:

3. Inducir la muerte celular agregando Sustancia P a concentración final 100 nM, variando los tiempos a partir de la inducción, con las siguientes condiciones:

Plásmido transfectado	<i>Tiempo transcurrido tras adición de SP</i>
pcDNA3.1	Tiempo 0 (+H ₂ O)
pcDNA3.1	3 horas
pcDNA3.1	6 horas
pcDNA3.1	12 horas
NK ₁ R	Tiempo 0 (+H ₂ O)
NK ₁ R	3 horas
NK ₁ R	6 horas
NK ₁ R	12 horas

Con el fin de contar con un control positivo del descenso de ATP intracelular en cada ensayo, se agrega IOA (Iodoacetato) a diferentes tiempos a células sin transfectar, con la siguiente distribución:

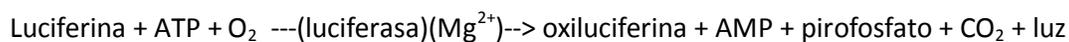
<i>Tiempo transcurrido tras adición de IOA</i>
Tiempo 0 (+H ₂ O, sin IOA)
30 minutos
60 minutos

4. Retirar el medio de los pozos, lavar cada pozo con 1 ml de PBS frío, una sola vez, con cuidado.
5. Retirar el PBS.
6. En hielo, agregar a cada pozo 100 µl de buffer de lisis liberador de ATP. Dejarlo actuar por 5 a 10 minutos.
7. Al finalizar el tiempo de acción del buffer de lisis, coleccionar con una pipeta las muestras de cada pozo y colocarlas en tubos eppendorf marcados de manera correspondiente.

Almacenar a -70°C para su posterior análisis.

Medición de ATP utilizando kit bioluminiscente (Molecular Probes #A22066)

La medición de ATP se llevó a cabo por medio de un ensayo bioluminiscente con luciferasa recombinante de luciérnaga y su sustrato, D-luciferina. El ensayo permite la determinación cuantitativa de ATP, basándose en el requerimiento de ATP por parte de la luciferasa para producir luz al procesar su sustrato (máximo de emisión ~560 nm, a pH 7.8), por medio de la reacción:



Este ensayo es extremadamente sensible; la mayoría de los luminómetros pueden detectar hasta 0.1 picomoles de ATP.

Preparación de muestras

1. Se realiza una dilución 1:1000 de ATP 1 mM

10 µl de ATP 1 mM + 990 µl de H₂O = concentración final 10 µM

2. Se preparan las diluciones para la curva estándar:

Concentración ATP	ATP 10 µM	H₂O	Total
3.9 pmol	3.9 µl	996 µl	100 µl
7.8 pmol	7.8 µl	992 µl	100 µl
15 pmol	15.6 µl	984.4 µl	100 µl
31 pmol	31.2 µl	968.8 µl	100 µl
62 pmol	62.5 µl	937.5 µl	100 µl
125 pmol	125 µl	875 µl	100 µl
250 pmol	250 µl	750 µl	100 µl

3. Pipetear y mezclar con vortex el contenido de cada tubo.
4. Preparar el buffer de reacción (10 ml):

H₂O	8.9 ml
Buffer de reacción 20X	0.5 ml
DTT 0.1 M	0.1 ml
Luciferina preparada	0.5 ml
Luciferasa	2.5 ml

Determinación:

1. Preparar celdas y colocar 20 µl de muestra en la celda correspondiente, aforar a 100 µl con agua. Colocar la muestra en el fondo de las celdas. Agitar la muestra con el vortex.
2. Arreglar dos blancos, con 100 µl de agua solamente.

El volumen de reacción añadido por muestra es de 400 µl (volumen total 500 µl).

3. Colocar las celdas con las muestras de la curva, y las muestras a analizar en el carrusel del luminómetro, y medir.
4. Posterior a la medición de las muestras, las muestras se sonicán para fragmentar estructuras no lisadas, y se cuantifica la cantidad de proteína en cada muestra.
5. Normalizar las mediciones de ATP obtenidas con respecto a la cantidad de proteína presente en cada muestra.

RESULTADOS.

1. Modelo de muerte autofágica mediada por NK₁R/SP.

Se establecieron las condiciones de transfección con alta eficiencia utilizando CaCl₂ y buffer HBS pH 7.0 (ver detalles en la sección de métodos), obteniendo una eficiencia superior al 90% en células HEK293T transfectadas con un vector de expresión de proteína verde fluorescente (GFP). La eficiencia se comprobó comparando la cantidad de células fluorescentes con las células totales para cada campo observado. Posteriormente, se montó el ensayo de muerte autofágica que se utilizó para todos los experimentos de este proyecto; células HEK293T fueron transfectadas con un vector de expresión de NK₁R, o bien con el vector vacío (pcDNA3.1) y posteriormente fueron expuestas a sustancia P (SP) o a agua por 24 h.

Se cuantificó la muerte celular por exclusión de azul de tripano y se observó la morfología bajo el microscopio. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos de un experimento típico.

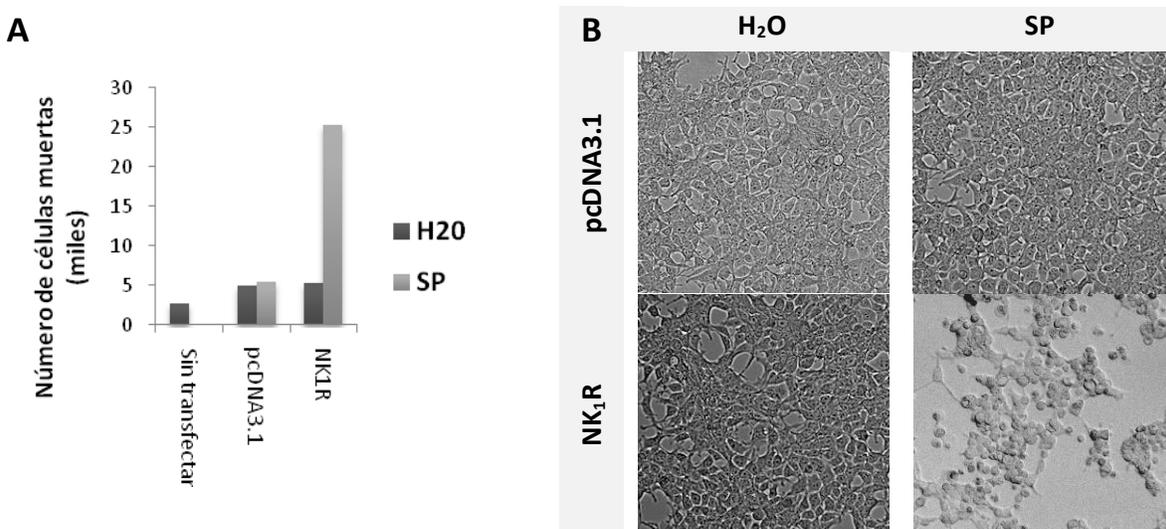


Figura 9. Ensayo representativo de muerte autofágica mediada por NK₁R/SP. Células HEK293T fueron transfectadas con un vector de expresión de NK₁R o bien con el vector vacío (pcDNA3.1). Las células fueron expuestas a SP o a agua por 24 h. Las células flotantes fueron colectadas y se cuantificó la muerte celular por exclusión de azul de tripano (panel A). Se observó un notable incremento de células muertas al añadir SP a células transfectadas con NK₁R, en comparación con las demás condiciones. También se observó la morfología bajo el microscopio de contraste de fase, a un aumento de 10X (panel B), donde las células que expresan NK₁R y se les añadió SP, se observan redondeadas y desprendidas del sustrato. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

Es notable el incremento en el número de células muertas en las células transfectadas con NK₁R a las cuales se agregó SP, con respecto a las demás condiciones. Además, la observación en el microscopio de luz muestra la diferente morfología de las células transfectadas con NK₁R y expuestas a SP, las cuales lucen redondeadas, y en su mayoría se encuentran desprendidas del sustrato y flotando en el medio. En contraste, las células transfectadas con el vector vacío, o aquellas a las cuales se les agregó H₂O en lugar de SP, aparecen aún adheridas y con la morfología fusiforme típica de las células HEK293T en condiciones normales de cultivo (panel B).

El tipo de muerte inducida por la interacción NK₁R/SP ha sido previamente caracterizado como de tipo autofágico, mediado por el receptor NR4A1 (Castro-Obregon, Rao et al. 2004). El ensayo es altamente reproducible (Castro-Obregon, del Rio et al. 2002).

2. mTOR no se activó durante la muerte autofágica.

Nuestra hipótesis de trabajo implica la inactivación de la cinasa mTOR, ya que ésta inhibe a la autofagia. Debido a que mTOR es una proteína de alto peso molecular (289 kDa), su detección por medio de Western blot resultó problemática. Como una alternativa para estudiar su estado de activación durante la muerte autofágica, se detectó la fosforilación de su sustrato, la proteína S6K. A manera de control se detectó también la proteína S6K total.

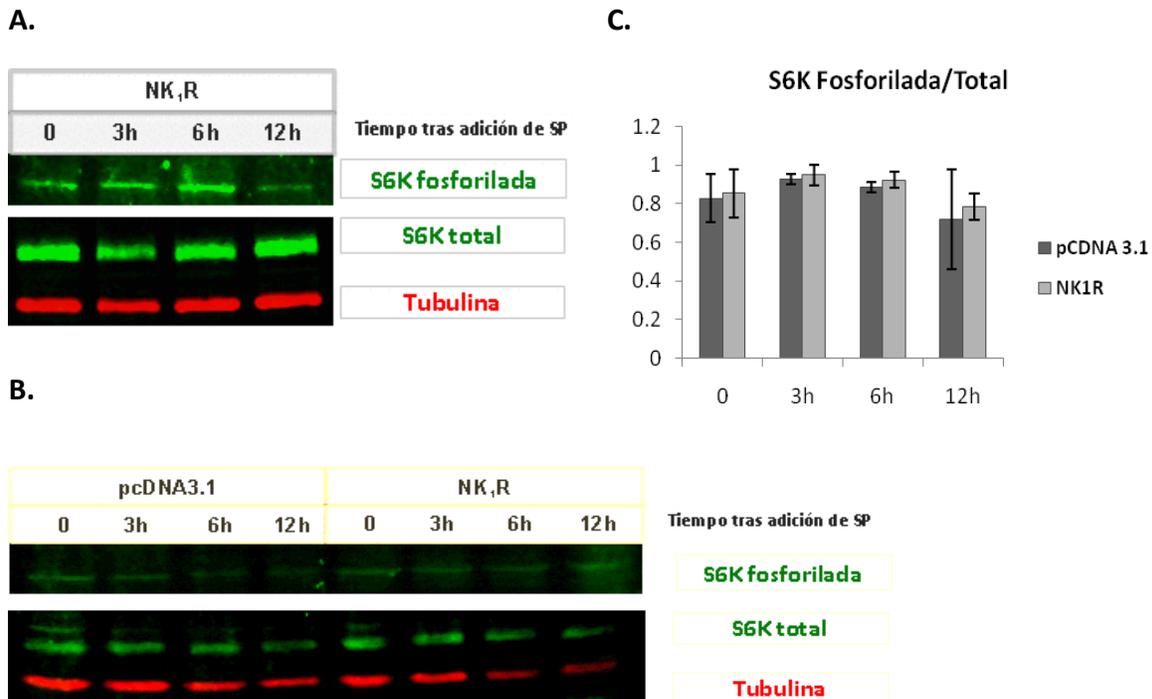


Figura 10. La cinasa mTOR no se activó durante la muerte autofágica, como indica la limitada fosforilación de su sustrato, S6K. Células transfectadas con los vectores indicados, y posteriormente expuestas o no a SP por el tiempo indicado. **A y B.** Resultados de dos ensayos de Western blot representativos incluidos en el análisis densitométrico. Tubulina fue detectada como control de carga. **C.** Análisis densitométrico de tres ensayos de Western blot, se muestra la proporción de la cantidad de S6K fosforilada con respecto a S6K total para cada condición señalada. No se observa una diferencia significativa entre las condiciones control y aquellas donde se indujo muerte autofágica ($p < 0.05$). Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$).

Se observó que la fosforilación de S6K, sustrato de mTOR, no aumenta durante la muerte autofágica, con respecto a las condiciones control (paneles A y B), lo cual fue confirmado por el análisis densitométrico de las bandas correspondientes (panel C). Esto refleja, de manera consistente con la hipótesis, que no hay una activación de mTOR tras la inducción de la muerte autofágica.

3. Los niveles intracelulares de ATP no disminuyeron durante la muerte autofágica.

Ya que no se observó activación de mTOR, se procedió a explorar la hipótesis de que la activación transcripcional de genes glucoenogénicos por NR4A1 provocaría una disminución de los niveles intracelulares de ATP. Por lo tanto, como un primer paso, se procedió a cuantificar los niveles de ATP tras la inducción de muerte autofágica.

Puesto que no se había realizado anteriormente un ensayo de esta naturaleza con células HEK293T en cultivo en nuestro laboratorio, se consideró pertinente establecer un modelo de disminución de ATP intracelular como referencia para experimentos posteriores. Para ello se utilizó iodoacetato (IOA), un agente que actúa disminuyendo el ATP disponible. El iodoacetato bloquea la glucólisis al inhibir a la enzima GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), lo cual resulta en una reducción del piruvato, así como del ATP producido durante la glucólisis. Al limitar la cantidad de piruvato disponible, la síntesis de ATP en la mitocondria decae notablemente.

Se utilizó un ensayo bioluminiscente, consistente en la reacción de luciferasa dependiente de ATP (ver detalles en la sección de métodos). Los resultados del tratamiento con IOA se muestran en la tabla 1.

Muestra	Lectura luminiscencia (actividad de luciferasa)	Concentración de proteína en la muestra	pmol ATP/μg proteína
IOA t0 (5 min buffer)	205.18 pmol	6.7	30.62
IOA 30 min (5 min buffer)	207.91 pmol	8.45	24.6
IOA 60 min (5 min buffer)	138.76 pmol	10	13.87
IOA t0 (10 min buffer)	269.98 pmol	10.8	24.99
IOA 30 min (10 min buffer)	189.37 pmol	10.5	18.03
IOA 60 min (10 min buffer)	95.19 mol	10.3	9.24

Tabla 1. Disminución de ATP intracelular por exposición a IOA. Células fueron cultivadas en medio DMEM con agua (t0) o expuestas al medio con IOA por los tiempos indicados. El tiempo de acción del buffer de lisis empleado en cada caso se muestra en paréntesis (5 ó 10 min). Se observa una disminución progresiva en los niveles de ATP conforme aumenta el tiempo de exposición al IOA, con relación a las muestras control (t0).

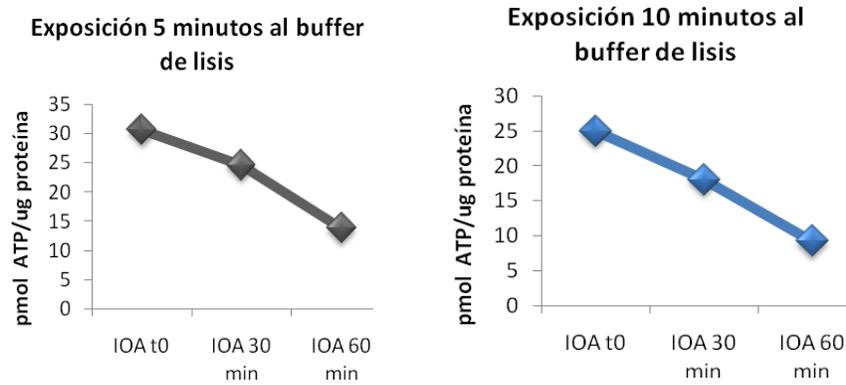
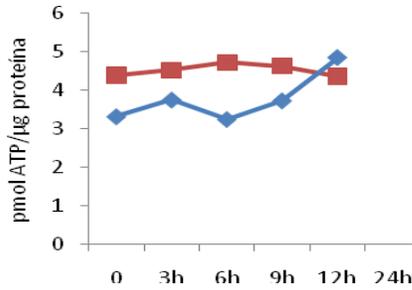


Figura 11. El ATP intracelular desciende al agregar IOA. Células fueron cultivadas en medio DMEM con agua (t0) o expuestas a IOA por los tiempos indicados. Se observa una disminución progresiva en los niveles de ATP conforme aumenta el tiempo de exposición al IOA, con relación al control (t0). Se probaron diferentes tiempos de lisis para las muestras, como se indica. El patrón de descenso gradual de ATP en ambas exposiciones resultó similar. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

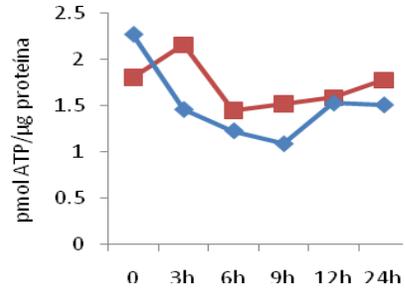
Como se puede apreciar en la figura 11, en ambas condiciones, se observó un descenso progresivo de los niveles de ATP, directamente proporcional al tiempo de exposición al IOA. En las condiciones probadas, el ensayo resultó ser altamente reproducible, como lo refleja el patrón obtenido a diferentes tiempos de exposición al buffer de lisis. El nivel de ATP intracelular en células HEK293T baja hasta la mitad, aproximadamente, tras una hora de exposición al IOA. Para un descenso más drástico se requiere una exposición más prolongada al IOA.

Una vez establecido el control de descenso de ATP, se procedió a determinar si durante la muerte autofágica disminuyen los niveles de ATP, para lo cual se llevó a cabo una cinética colectando las muestras cada 3 horas, hasta las 12 tras la inducción de la muerte por adición de SP. El tiempo inicial de 3h fue establecido tomando en cuenta que es en dicho momento que la expresión de NR4A1 es más abundante, tras la inducción de la muerte al agregar SP a células expresando el receptor NK₁R (Castro-Obregon, Rao et al. 2004).

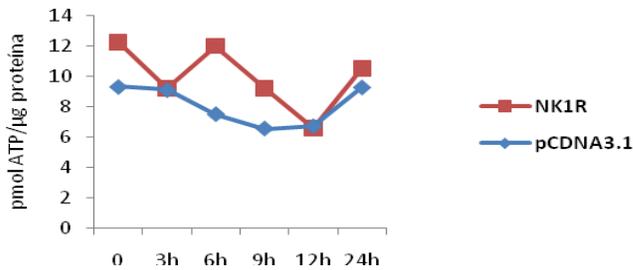
En la figura 12, correspondiente a los resultados de la tabla 2, se presentan datos de tres experimentos independientes, ya que si bien existen fluctuaciones entre las condiciones de muerte autofágica y las células control, no existe un patrón que se reproduzca entre un experimento y otro. Sin embargo, se puede interpretar que los niveles de ATP intracelulares en las muestras transfectadas con NK₁R no muestran un descenso progresivo tras la inducción de la muerte autofágica, y en general se encuentran por encima de las muestras control correspondientes a cada tiempo. Existe una gran variabilidad en la cantidad de pmol ATP/μg proteína detectada en cada experimento independiente, de modo que cambios sutiles en los niveles de ATP durante la muerte podrían quedar enmascarados por dichas fluctuaciones, a pesar de la alta sensibilidad del ensayo utilizado.



A. EXPERIMENTO 1.



B. EXPERIMENTO 2.



C. EXPERIMENTO 3.

Figura 12. Los niveles intracelulares de ATP no disminuyeron durante la muerte autofágica en los tiempos analizados. Células fueron transfectadas con los vectores indicados y expuestas o no a SP por los tiempos señalados. Los niveles de ATP intracelulares correspondientes a cada condición fueron medidos por medio de un ensayo de luciferasa (detalles en material y métodos). Los paneles A, B y C corresponden a experimentos independientes, relacionados con los correspondientes incisos de la tabla 2. No se observa un decremento en los niveles de ATP en las condiciones de muerte autofágica en relación con las condiciones control.

Muestra (A. Experimento 1)	pmoles de ATP en la muestra	Concentración de proteína en la muestra (μg)	pmol ATP/μg proteína
<i>pcDNA 3 t0</i>	427 pmol	45.75	9.33
<i>pcDNA3 3h</i>	401 pmol	43.95	9.12
<i>pcDNA3 6h</i>	408 pmol	54.3	7.51
<i>pcDNA3 9h</i>	404 pmol	61.65	6.55
<i>pcDNA3 12h</i>	339 pmol	50.55	6.7
<i>pcDNA3 24h</i>	448 pmol	48.15	9.3
<i>NK1R t0</i>	443 pmol	36.15	12.25
<i>NK1R 3h</i>	435 pmol	47.1	9.2
<i>NK1R 6h</i>	402 pmol	33.3	12
<i>NK1R 9h</i>	353 pmol	38.25	9.22
<i>NK1R 12h</i>	413 pmol	62.85	6.57
<i>NK1R 24h</i>	436 pmol	41.4	10.53
Muestra (B. Experimento 2)	pmoles de ATP en la muestra	Concentración de proteína en la muestra (μg)	pmol ATP/μg proteína
<i>pcDNA 3 t0</i>	162 pmol	48.6	3.33
<i>pcDNA3 3h</i>	150 pmol	39.8	3.76
<i>pcDNA3 6h</i>	119 pmol	36.4	3.26
<i>pcDNA3 9h</i>	142 pmol	37.9	3.74
<i>pcDNA3 12h</i>	169 pmol	34.7	4.86
<i>NK1R t0</i>	181 pmol	41.2	4.4
<i>NK1R 3h</i>	197 pmol	43.5	4.53
<i>NK1R 6h</i>	170 pmol	35.9	4.73
<i>NK1R 9h</i>	155 pmol	33.4	4.64
<i>NK1R 12h</i>	136 pmol	31.2	4.37
Muestra (C. Experimento 3)	pmoles de ATP en la muestra	Concentración de proteína en la muestra (μg)	pmol ATP/μg proteína
<i>pcDNA 3 t0</i>	243.6 pmol	107.25	2.27
<i>pcDNA3 3h</i>	135.51 pmol	92.25	1.46
<i>pcDNA3 6h</i>	119.87 pmol	96.9	1.23
<i>pcDNA3 9h</i>	143.5 pmol	130.95	1.09
<i>pcDNA3 12h</i>	150.6 pmol	98.1	1.53
<i>pcDNA3 24h</i>	156.5 pmol	103.05	1.51
<i>NK1R t0</i>	248 pmol	136.65	1.81
<i>NK1R 3h</i>	223.6 pmol	103.05	2.16
<i>NK1R 6h</i>	128.7 pmol	88.65	1.45
<i>NK1R 9h</i>	131.7 pmol	86.55	1.52
<i>NK1R 12h</i>	138.52 pmol	86.85	1.59
<i>NK1R 24h</i>	150.7 pmol	84.6	1.78

Tabla 2. Los niveles de ATP intracelular no descendieron durante la muerte autofágica a los tiempos analizados. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes. Los tres experimentos mostrados corresponden a las gráficas de la figura 12.

4. AMPK no se activó durante la muerte autofágica.

Debido a que no se observó una caída en los niveles de ATP, pero tampoco se obtuvieron resultados que permitan concluir que no hay fluctuaciones relacionadas con la inducción de la muerte autofágica (figura 12), se procedió a revisar si la cinasa activada por AMP, AMPK, se activa durante la muerte autofágica, con el fin de tener un indicador más de la relación AMP/ATP intracelular en las diferentes condiciones analizadas.

Para establecer un control positivo de la fosforilación de AMPK, se transfectaron células HEK293T con p53, ya que se conoce que la presencia de dicha proteína aumenta la fosforilación de AMPK.

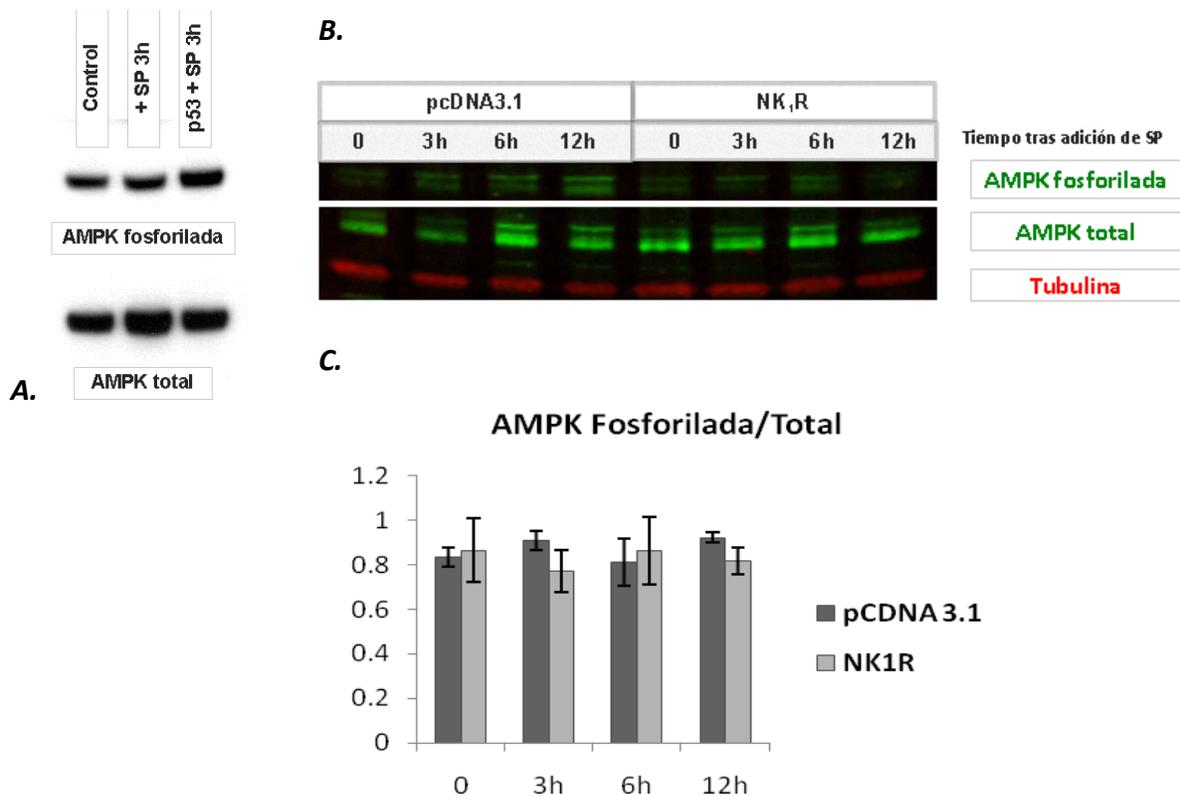


Figura 13. La fosforilación de AMPK no aumentó tras la inducción de la muerte autofágica.

Células fueron transfectadas con los vectores indicados y expuestas o no a SP por los tiempos señalados. **A.** No se observó inducción de AMPK a las tres horas tras la adición de SP, en comparación con células sin transfectar (control), se incluyeron células transfectadas con p53 como control positivo. **B.** En una cinética más larga, tampoco se observó activación de AMPK tras la inducción de muerte autofágica. Se detectó tubulina como control de carga. **C.** Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a cada condición señalada, se muestra la proporción de la cantidad de AMPK fosforilada con respecto a AMPK total. No se observó una

diferencia significativa entre las condiciones donde se indujo muerte autofágica con respecto a las condiciones control ($p < 0.05$). Las barras de error muestran la desviación estándar ($n = 3$).

Como se observa en la figura 13, en general, la forma fosforilada de AMPK es mucho menos abundante que la total, y resultó menor a las 3 horas de inducir la muerte autofágica, que la de las células de la muestra control (con relación a la forma total en cada caso). En el control positivo, consistente en la transfección de p53 (que también fue tratado con SP), resulta claro el incremento en la cantidad de proteína AMPK fosforilada con respecto a la proteína total; también se observa una inducción con respecto a las células que no fueron transfectadas con p53 (figura 13 A).

La fosforilación de AMPK se midió originalmente a las 3 horas, por ser éste el tiempo en que se observa la mayor cantidad de NR4A1. Sin embargo, considerando que la activación de AMPK pudiera tomar más tiempo, se repitió el análisis haciendo una cinética hasta las 12 horas tras la adición de SP (figura 13 B). Si bien hay fluctuaciones en las condiciones control, en las de muerte autofágica no se observa un incremento de la fosforilación de AMPK; sin embargo, el análisis estadístico mostró que el decremento observado tras 3 horas de la inducción de la muerte autofágica no es significativo ($p < 0.05$).

Siendo una cinasa activada por bajos niveles de ATP en la célula, la ausencia de activación de AMPK, detectada por medio de su fosforilación tras la inducción de muerte autofágica, es consistente con la falta de decremento de los niveles de ATP observada previamente.

5. La expresión de DRAM no aumentó durante la muerte autofágica.

Considerando la interacción física que ocurre entre NR4A1 y p53 durante la muerte autofágica, se procedió a determinar si la muerte autofágica mediada por NR4A1 se encontraba relacionada con cambios en la expresión de DRAM. Existen dos isoformas descritas de DRAM: una más pequeña, de 15 kDa y otra mayor, de aproximadamente 30 kDa. En el análisis de extractos provenientes de células HEK293T pueden observarse bandas correspondientes a ambas isoformas, si bien la banda de 15 kDa aparece como un doblete (figura 14 A).

Como se puede observar en la figura 14, no hubo un incremento en los niveles de DRAM tras la inducción de muerte autofágica, al comparar la intensidad de las bandas con la de las condiciones control (figura 14 B). Sin embargo, si bien en el análisis densitométrico se observó una tendencia al incremento progresivo tras la inducción de muerte autofágica (células transfectadas con NK₁R y tratadas con SP en diferentes tiempos), los datos disponibles no permiten hacer un análisis estadístico para determinar si la diferencia es significativa con respecto a las condiciones control (células transfectadas con pcDNA3.1 y tratadas con SP en diferentes tiempos). El reducido número de resultados obtenidos es debido a la dificultad para detectar a DRAM por medio de Western blot. El análisis correspondiente a la banda de 30 kDa no se muestra, debido a su difícil detección en los ensayos, pues es mucho menos abundante que la isoforma de 15 kDa.

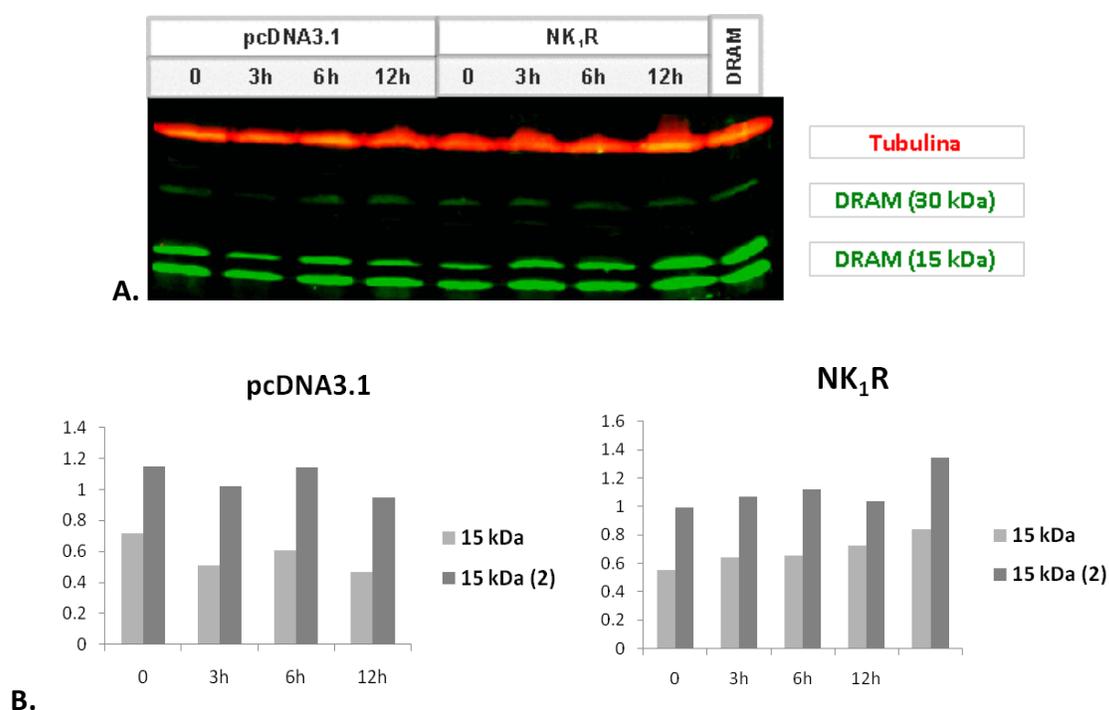


Figura 14. *La expresión de DRAM no aumentó durante la progresión de la muerte autofágica.* Células transfectadas con los vectores indicados y expuestas o no a SP por los tiempos señalados. **A.** Imagen representativa de Western blot. No hubo un incremento apreciable en la intensidad de las bandas detectadas, tras la inducción de muerte autofágica; los tiempos señalados indican el intervalo transcurrido tras la adición de SP. Células transfectadas con DRAM fueron utilizadas como control positivo, en el carril señalado. Se detectó tubulina como control de carga. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de 15 kDa de DRAM. En ambos análisis, la normalización se llevó a cabo utilizando tubulina como referencia. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes.

6. Selección de aptámeros específicos para NR4A1.

Los resultados obtenidos sugieren que el mecanismo por medio del cual NR4A1 modula la autofagia no involucra la caída de los niveles de ATP intracelulares (potencialmente causada por la expresión de genes gluconeogénicos); sin embargo, no descartan la posibilidad de que dicha modulación se lleve a cabo por medio de la inducción de la expresión de DRAM, aunque no pudo determinarse si el aumento fue significativo. Tomando en cuenta que NR4A1, en su acción nuclear, podría activar la transcripción de otros blancos, se decidió optar por un enfoque más amplio que nos permitiera discernir entre su actividad como factor transcripcional y su actividad citoplásmica.

Con el fin de estudiar si la actividad transcripcional de NR4A1 es indispensable para la progresión de la muerte autofágica, el siguiente objetivo de este trabajo fue obtener herramientas que permitieran dicho estudio. Se conoce que el efecto del silenciamiento o inhibición de NR4A1 (utilizando RNA de interferencia o proteínas mutantes dominantes negativas de NR4A1) evita la progresión de la muerte autofágica; sin embargo, dichas estrategias bloquean la funcionalidad completa de la proteína y no permiten discriminar entre los diferentes mecanismos por medio de los cuales NR4A1 es capaz de actuar. Ya que NR4A1 está compuesto de varios dominios con funciones definidas (transactivación, unión al DNA, unión a ligando, dimerización), sería posible estudiarlo de manera modular (Eells 2000); es por ello que se decidió buscar aptámeros capaces de unirse con alta afinidad al dominio de unión al DNA de NR4A1, con el fin utilizarlos como herramientas para bloquear la actividad transcripcional de dicha proteína, permitiendo la interacción de NR4A1 con otras proteínas por medio de los otros dominios que la componen.

Los aptámeros son fragmentos cortos de ácidos nucleicos (DNA o RNA), generalmente de cadena sencilla, que son capaces de adoptar estructuras tridimensionales complejas. Dicha capacidad les permite unirse de manera específica a diversos blancos que pueden consistir en moléculas, tejidos y hasta organismos completos por medio de interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, apilamiento de anillos aromáticos, fuerzas de van der Waals, compatibilidad estructural con el blanco, o una combinación de dichos factores (Stoltenburg 2007).

Los aptámeros con alta afinidad y especificidad para un blanco determinado pueden ser seleccionados por medio de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), a partir de una biblioteca de alta diversidad consistente en oligómeros de secuencia variable flanqueados por secuencias constantes que permitan su replicación y marcaje. Dicho acervo de oligómeros es incubado con el blanco, tras lo cual se realiza un lavado para retirar todos aquellos fragmentos de ácido nucleico que no se encuentran unidos al blanco. Una vez descartado el resto, los oligómeros de interés que se encuentran unidos al blanco son entonces eluidos y amplificados por medio de PCR. El proceso es esquematizado en la figura 15. En el caso de oligómeros de RNA, éstos pueden ser amplificados por medio de la reacción isotérmica de la replicasa Qbeta (ver figura 16). El producto de dicha amplificación es nuevamente incubado con el blanco, y se repite el ciclo de lavado, elución y amplificación cuantas veces sea necesario para asegurar la especificidad

y afinidad de los aptámeros obtenidos. Por medio de SELEX, es posible obtener aptámeros de afinidad comparable a la que muestran los anticuerpos monoclonales (Stoltenburg 2007).

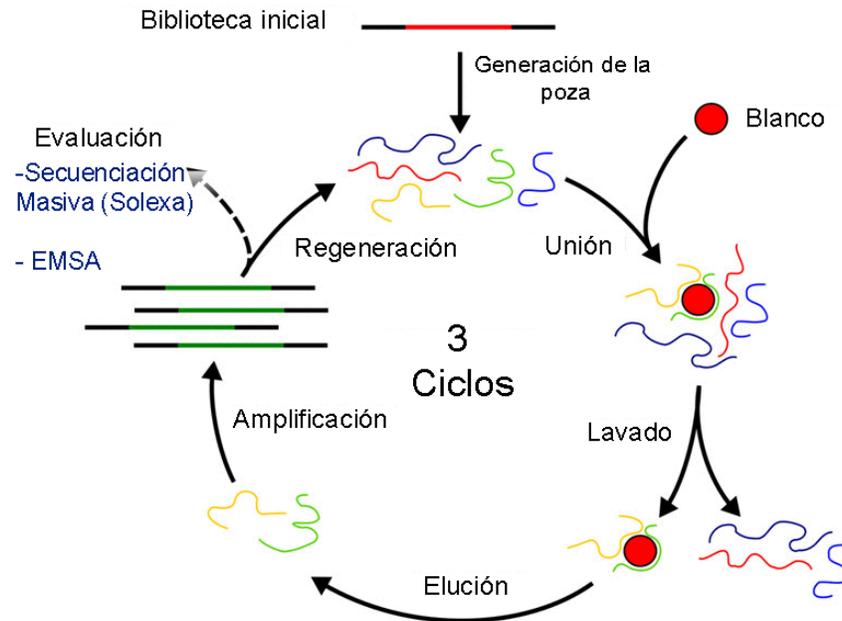


Figura 15. Selección de aptámeros por medio de SELEX. La proteína blanco es incubada con una poza de oligonucleótidos altamente diversa (unión), tras lo cual se realizan lavados para eliminar aquellos oligonucleótidos que no se unieron a la proteína. Posteriormente, los oligonucleótidos que se unieron a la proteína blanco son eluidos y amplificados por PCR para así regenerar una nueva poza seleccionada para iniciar otro ciclo. En este caso, se realizaron 3 ciclos (o rondas de selección) para la obtención de aptámeros. Las pozas de oligonucleótidos seleccionados en cada ronda de selección fueron analizadas por medio de secuenciación masiva para identificar las secuencias más abundantes en cada ronda. Los ensayos de movilidad (EMSA) pueden utilizarse como una forma para evaluar si los aptámeros obtenidos son capaces de unirse al blanco.

Por medio de SELEX es posible encontrar, entre los aptámeros obtenidos, aquellos que sean capaces de unirse, con gran afinidad, solamente al dominio de unión al DNA de la proteína estudiada (en este caso NR4A1) como es el caso de los aptámeros obtenidos para la proteína NFAT (Nuclear factor of activated T cells) (Cho 2004), y aquellos que bloquean el dominio de unión al DNA de HSF (Heat shock factor) inhibiendo así su actividad transcripcional (Zhao 2006). Dicha inhibición por medio de aptámeros permitirá evaluar la importancia de la actividad transcripcional de NR4A1 dentro del modelo de muerte autofágica establecido.

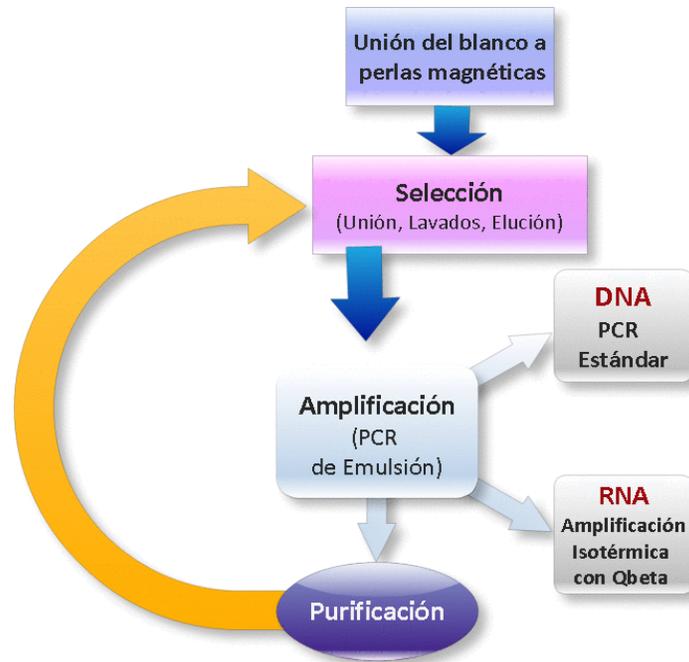


Figura 16. Procedimiento de selección de aptámeros utilizado. Para detalles, ver el texto.

En el laboratorio del Dr. Jörn Glökler, en el Instituto Max Planck de Genética Molecular, en Berlín, Alemania, se desarrolló un nuevo método para seleccionar los aptámeros en menor tiempo. Se estableció una colaboración con él, por lo que realicé una estancia de dos meses en su laboratorio.

Previo a esa estancia, en el laboratorio del Dr. Zoltán Konthur, también en el Instituto Max Planck de Genética Molecular, en Berlín, Alemania, se realizó la purificación de las proteínas blanco, en este caso NR4A1 y p53. Dichas proteínas fueron previamente modificadas por la Dra. Susana Castro Obregón para: 1) marcarlas con una cola de histidinas y poder purificarlas mediante una columna de Niquel; 2) introducir una señal bacteriana de biotilación para marcarlas *in vivo* (al ser expresadas en una cepa de *E. coli* que expresa la ligasa de biotina) para su posterior inmovilización en perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina.

En el laboratorio del Dr. Glökler se realizaron dos ensayos simultáneos de SELEX utilizando a la proteína NR4A1 y a otras proteínas no relacionadas con este estudio (de interés para otros proyectos y que fueron utilizados como control en el análisis de datos), como blanco. Para el primer ensayo, se utilizaron diferentes bibliotecas de DNA de doble cadena compuestas de oligómeros de 20, 30 y 40 bases de longitud, seleccionadas de acuerdo al tipo de blanco utilizado. La biblioteca de oligómeros utilizada para la selección de aptámeros para NR4A1 fue Bank20 (que contiene fragmentos de veinte bases de longitud). Para el ensayo de selección de RNA, se utilizó la biblioteca Bank40. Dichas bibliotecas contienen una diversidad de alrededor de 10^9 secuencias diferentes.

Las muestras fueron analizadas por medio de secuenciación masiva (SOLEXA).

Posteriormente, dada la relevancia de la proteína p53 para nuestro estudio, y ya que al igual que NR4A1 funciona como un factor transcripcional, se decidió hacer una selección de aptámeros también para p53. Se realizaron dos selecciones: la primera, empleando una biblioteca consistente en fragmentos de DNA de cadena sencilla de 40 bases de longitud (Bank40); la segunda, usando una biblioteca consistente en fragmentos de alrededor de 100 bases de longitud (DNA de cadena sencilla) obtenidos a partir de DNA genómico humano.

Para validar la selección en estos dos últimos ensayos de SELEX, las muestras enriquecidas fueron sometidas a un ensayo de diversidad, en el cual se mide, durante un ensayo de PCR en tiempo real, la fluorescencia observada durante el proceso de desnaturalización del DNA, bajo el principio de la relación inversamente proporcional entre la presencia de ácidos nucleicos de doble cadena (que son marcados con colorante fluorescente) y la diversidad presente en la muestra (figura 17).

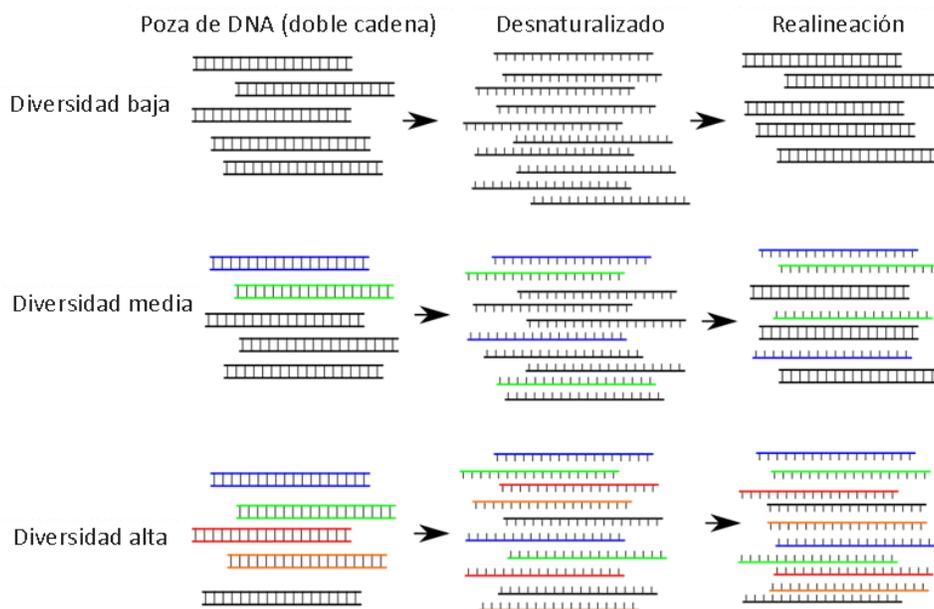


Figura 17. Ensayo de diversidad. Cada poza seleccionada de oligómeros de DNA de doble cadena contiene una variedad de secuencias. Tras ser desnaturalizadas a 98° C, las muestras de oligómeros son sometidas a un ciclo de realineación a 20° C. Dependiendo del grado de complejidad de la muestra, los oligómeros podrán encontrar una secuencia complementaria con mayor o menor facilidad. Debido a que el ensayo utiliza un colorante fluorescente que se une al DNA de doble cadena, la fluorescencia detectada en el ensayo en un momento dado es una medida del apareamiento de las moléculas presentes en cada muestra, reflejando su complejidad.

En el caso de la selección llevada a cabo utilizando el Bank40 (cadena sencilla), tanto para p53 como para NR4A1 (figura 18), la temperatura de desnaturalización requerida para cada ronda de selección es progresivamente mayor, con respecto a la muestra de oligómeros de Bank40 sin seleccionar, lo cual es indicativo de un decremento de diversidad conforme se avanza en el proceso de selección.

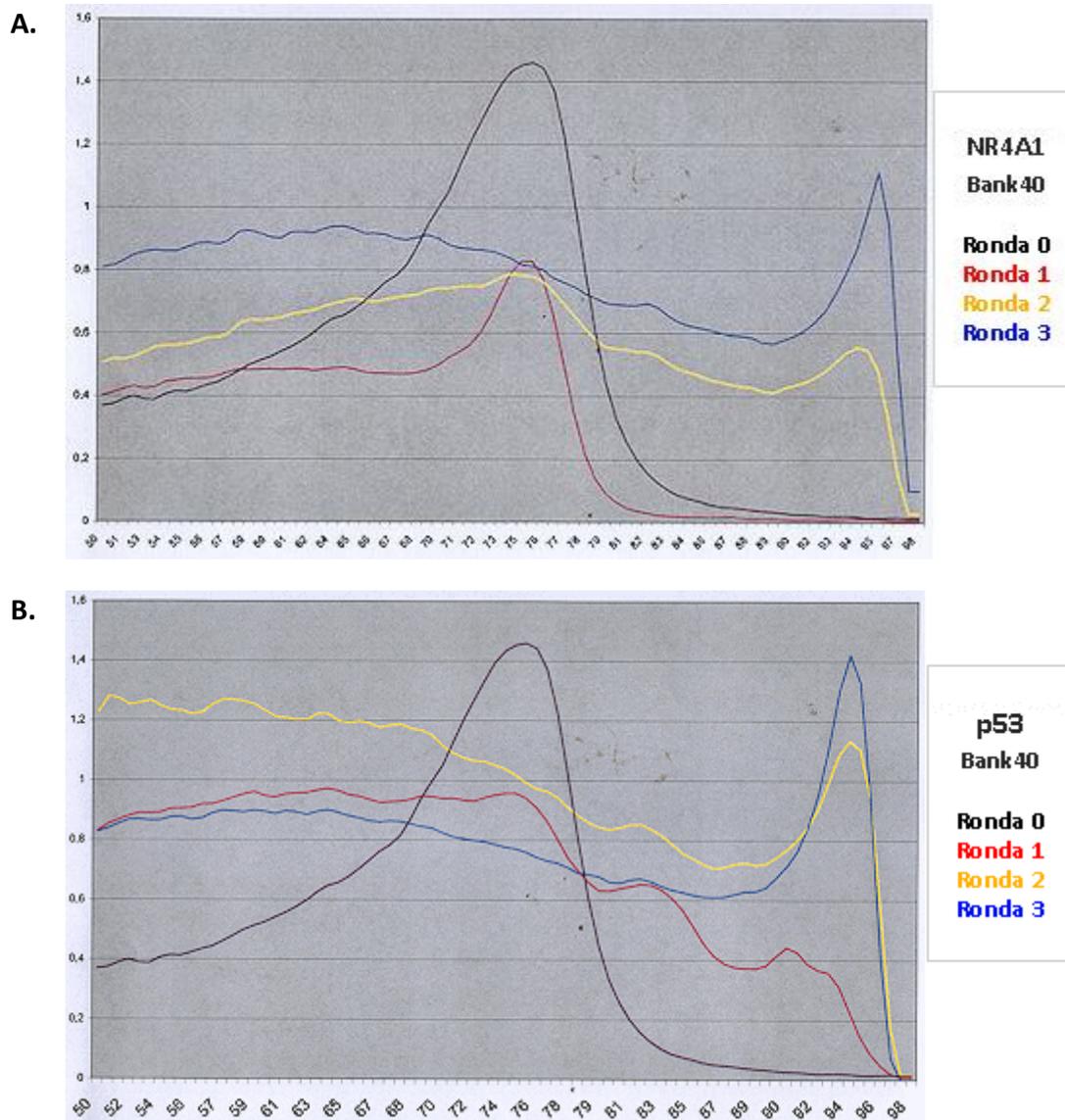


Figura 18. La diversidad de oligómeros presentes en cada muestra disminuye con cada ronda de selección de aptámeros para NR4A1 y p53. Ensayo de RT-PCR, utilizado para evaluar la complejidad de las diferentes muestras de oligómeros, reflejada en la medida de la fluorescencia detectada a lo largo del ensayo. Tras ser desnaturalizadas inicialmente, las muestras de oligómeros fueron sometidas a un ciclo de realineación a 20° C, con un incremento de temperatura progresivo hasta alcanzar nuevamente la temperatura de desnaturalización (98° C). La temperatura se muestra en el eje x, el eje y muestra unidades de fluorescencia. Cada línea representa una muestra perteneciente a una ronda de selección (ronda 1, 2 o 3), o a la poza de oligonucleótidos sin seleccionar (ronda 0, Bank40). Se observa un incremento progresivo en la temperatura de desnaturalización para cada ronda de selección con respecto a la poza de oligonucleótidos sin seleccionar, tanto para las muestras de la selección contra NR4A1 (panel A) como para p53 (panel B).

Una vez validada la selección de posibles aptámeros, por medio de secuenciación masiva, se conocieron las secuencias correspondientes a los oligómeros enriquecidos. Tomando los datos de la selección realizada a partir de la biblioteca Bank20 (DNA de doble cadena), la Dra. Katja Nowick en el Instituto Max Planck de Genética Molecular en Berlín, Alemania, llevó a cabo un análisis bioinformático para determinar si entre las secuencias obtenidas se encontraban algunas semejantes a las de los elementos NuRE (consenso: 5'-TGATATTTACCTCAAATGCC-3') o NBRE (consenso: 5'-AAAGGTCA-3'), que son reconocidas por el dominio de unión al DNA de NR4A1.

Tras el conteo del número de veces que se encontró cada secuencia, los motivos más enriquecidos en cada ronda de selección fueron:

Primera ronda:
GGCCNNCCCCCCCCCTCCCCT
Segunda ronda:
CGGGNGNNGTTTTTAANNTCNNNCCCGA
Tercera ronda:
AGGGGCACCCCCC_ ACCTCC _CCCCCCCCCTCCCCTCC

ACCTCC = Motivo de unión como dímero de NR4A1

Como se puede apreciar, en la secuencia más enriquecida en la tercera ronda de selección contra NR4A1 se encuentra el motivo de NuRE, al cual NR4A1 se une como dímero (tabla 3). Esto sugiere fuertemente que el método de selección fue exitoso. Otros oligómeros cuyas secuencias no contenían elementos semejantes a NuRE o NBRE también se encontraron enriquecidos. Entre las secuencias menos enriquecidas, también se encontraron motivos (de 4 o 5 nucleótidos de longitud) correspondientes a la secuencia de unión como monómero para NR4A1.

ACCTCCC = Motivo de unión como dímero de NR4A1

NR4A1 Ronda #3 vs Control (Tercera ronda GR)	No. de veces presente	Posición por conteo en los datos	Conteo en el control	Conteo en los datos, Normalizado	Conteo en el control, Normalizado	Proporción octámero	Posición por proporción respecto al control
CACCTCCC	94	1	73	0.0081832	0.0018828	4.346381	7
GGCCCCC	76	2	107	0.0066162	0.0027597	2.397467	105
ACCACCC	75	3	83	0.0065291	0.0021407	3.050043	47
GGGGTGA	75	4	78	0.0065291	0.0020117	3.245559	35
ACCCGCC	71	5	68	0.0061809	0.0017538	3.524295	25
CGCACCC	71	6	58	0.0061809	0.0014959	4.131932	10
CCCGTCC	65	7	85	0.0056586	0.0021922	2.581174	82
CGACCCC	62	8	55	0.0053974	0.0014185	3.804975	14
ACCGCCC	60	9	79	0.0052233	0.0020375	2.56358	84
GGCACCC	49	10	83	0.0042657	0.0021407	1.992695	179
CCCAGCC	48	11	59	0.0041786	0.0015217	2.746073	65
CCCCATC	45	12	46	0.0039175	0.0011864	3.302003	34
GCCACCC	42	13	88	0.0036563	0.0022696	1.610977	238
GCCTCCC	40	14	90	0.0034822	0.0023212	1.500169	269
ACATCCC	39	15	48	0.0033951	0.001238	2.742497	66
AGCCCCC	38	16	58	0.0033081	0.0014959	2.211456	128
GCAACCC	38	17	56	0.0033081	0.0014443	2.290437	122
GCCGACC	38	18	48	0.0033081	0.001238	2.672177	70
TGCGCCC	36	19	50	0.003134	0.0012896	2.430274	98
ACCGTACC	35	20	80	0.0030469	0.0020633	1.476729	272
CGGGAGGG	34	21	30	0.0029599	0.0007737	3.825432	13
GGCGGCC	33	22	92	0.0028728	0.0023728	1.210734	330

Tabla 3. Motivos encontrados más frecuentemente entre las secuencias obtenidas de la tercera ronda de selección para NR4A1. El motivo más enriquecido encontrado entre las secuencias de la tercera ronda de selección coincide con el motivo NuRE, al cual NR4A1 se une como dímero. La variante de unión como monómero no se encontró enriquecida. Como control, se utilizaron los datos obtenidos de la selección de DNA (de la misma biblioteca) realizada para el Receptor de Glucocorticoides (GR). Ya que éste es también un receptor nuclear y por lo tanto los datos obtenidos no representan una distribución completamente al azar, se añadió un conteo de todos los octámeros posibles.

DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se realizaron experimentos para entender el mecanismo molecular por el cual el receptor nuclear NR4A1 podría activar la autofagia. Se consideró evaluar su papel como factor transcripcional induciendo gluconeogénesis fuera de contexto, resultando en un decremento en los niveles de ATP intracelulares con una consecuente inactivación de mTOR, o bien como modulador de la actividad de otras proteínas (como DRAM), mediado por p53. Si bien los resultados mostraron que no hay activación de mTOR, no se observó una alteración en las pozas de ATP ni activación de AMPK. Se detectó un ligero incremento en los niveles de DRAM tras la inducción de la muerte autofágica, sin embargo los datos disponibles al respecto no son suficientes para concluir si dicho incremento es significativo.

Las señales referentes al estado energético de la célula son integradas por mTOR. La activación de mTOR inhibe a la autofagia (Meley, Bauvy et al. 2006), sin embargo, un apagamiento de la actividad basal de mTOR detendría procesos favorecidos por la actividad de mTOR y requeridos para la autofagia, como lo es la síntesis de proteínas. Este razonamiento es consistente con los resultados obtenidos, donde si bien no se observa un decremento en la fosforilación del sustrato de mTOR, S6K, dicha fosforilación se mantiene limitada durante las condiciones de muerte autofágica, y se observa en cantidades similares a las de las condiciones control.

El estado energético de la célula constituye un aspecto fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. Ante una caída en los niveles de ATP, la célula cuenta con diversas alternativas para generar energía y de esta forma mantener el normal funcionamiento de los diversos procesos celulares (Hardie 2007). AMPK es una molécula central en el balance energético de la célula, actuando en respuesta al incremento de los niveles de AMP sobre los de ATP.

Es de esperarse que, al bajar los niveles de ATP, un aumento en la fosforilación, y por lo tanto, activación de AMPK podría darse en las condiciones de muerte autofágica, resultando en la pronta activación de diversas vías metabólicas que contribuyan a la restitución del ATP intracelular. Ésta podría ser una razón por la cual, en la cinética de la muerte autofágica, no se observa una disminución en los niveles de ATP. Sin embargo, existe una gran variabilidad en la cantidad de pmol ATP/ug proteína detectada entre un experimento y otro, de modo que cambios sutiles en los niveles de ATP durante la muerte podrían quedar enmascarados por dichas fluctuaciones. Además, debe tomarse en cuenta que las células analizadas (HEK293T) pertenecen a una línea inmortalizada, y por lo tanto se encuentran en estado de proliferación; diferentes estados del ciclo de división celular tienen diferentes requerimientos energéticos, por lo cual esta división constante puede ser una fuente de variabilidad en los niveles de ATP detectados en los experimentos realizados, además de que las células no están sincronizadas en el cultivo.

También es necesario recordar que, al estar constituido por complejos sistemas de reclutamiento y ensamblaje de moléculas, la autofagia es un proceso que requiere energía para llevarse a cabo (Meley, Bauvy et al. 2006), de modo que podría verse suspendido por un drástico descenso en los niveles de ATP disponibles. Sin embargo, no se observa un aumento en la fosforilación de AMPK durante la muerte autofágica. No obstante, una falta de activación de AMPK no impediría la progresión de la muerte autofágica, pues se ha observado que niveles basales de actividad de AMPK son suficientes para que la autofagia se lleve a cabo (Meley, Bauvy et al. 2006).

Existe la posibilidad de que en la muerte mediada por NR4A1 haya en efecto una baja en los niveles de ATP ocasionada por la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, y la ocurrencia de dicho suceso se presente en etapas muy tempranas tras la inducción de la muerte autofágica, de modo que al momento de colectar la primera muestra (3 horas tras la inducción de muerte, cuando NR4A1 es más abundante), el descenso ya ha sido compensado por la respuesta de vías metabólicas productoras de energía activadas por la detección de bajos niveles energéticos en la célula. Sin embargo, dicho escenario resulta improbable, pues en el análisis densitométrico se apreció un ligero decremento en la fosforilación de AMPK (que reflejaría niveles bajos de AMP) a las 3 horas tras la inducción de la muerte, evento que coincide con el momento en que la proteína de NR4A1 es más abundante en la célula (Castro-Obregon, Rao et al. 2004). Además, la inducción de los genes gluconeogénicos por acción de NR4A1 se observa entre 1 y 2 horas tras estimulación de cAMP en hepatocitos de ratón (Pei, Waki et al. 2006), dejando una ventana de tiempo reducida para la traducción de las proteínas correspondientes, activación de las enzimas y producción de glucosa por medio de gluconeogénesis.

Previamente se observó que NR4A1 y p53 interactúan en nuestro modelo de muerte autofágica. Dicha interacción pudiera repercutir en la activación de DRAM, al ser un blanco directo de p53. En este estudio no fue posible determinar si existe un incremento significativo en los niveles de DRAM tras la inducción de muerte autofágica. Hay que resaltar que la detección de DRAM por medio de Western blot resulta problemática; DRAM es una proteína de la cual se conocen al menos 5 isoformas (Crighton, Wilkinson et al. 2006), de las cuales sólo 2 son reconocidas por el anticuerpo utilizado. No se conoce el papel fisiológico de cada una, por lo que su asociación con la muerte autofágica permanece inexplorada, aunque este trabajo no descarta la posibilidad de que las isoformas pequeñas (de alrededor de 15 kDa) pudieran tener un papel en la muerte, al mostrar una ligera tendencia al incremento tras la inducción de la muerte autofágica mediada por NK₁R/SP. En cambio, la forma de aproximadamente 30 kDa es muy poco abundante y se detecta débilmente por medio de Western blot.

Al ser una proteína lisosomal con seis dominios transmembranales y unos pocos residuos expuestos (Crighton, Wilkinson et al. 2007), los anticuerpos disponibles en el mercado son muy poco eficientes y dan lugar a resultados difícilmente reproducibles, de modo que la limitación técnica podría enmascarar otros posibles resultados. Es por esta razón que se piensa cambiar la estrategia para detectar al mensajero de DRAM, por medio de RT-PCR, como un indicador de la regulación de su expresión durante la muerte autofágica. En caso de verificar la inducción de DRAM, será necesario determinar su participación en la muerte autofágica.

La selección de aptámeros contra NR4A1 constituye una novedosa estrategia para estudiar el papel de la actividad transcripcional de dicho receptor en el contexto de la muerte autofágica, al abrir la posibilidad de bloquear dicha actividad en específico, al tiempo que se dejan libres los demás dominios por medio de los cuales NR4A1 es capaz de interactuar con otras proteínas. NR4A1 ha sido observado interactuando con otras proteínas en la mitocondria (Zhan, Du et al. 2008), el citosol (Zhao, Chen et al. 2006) y el retículo endoplásmico (Liang, Song et al. 2007), de manera independiente a su actividad transcripcional; por lo tanto, el bloqueo del dominio de unión al DNA de NR4A1 por medio de aptámeros -sin alterar dicha capacidad de interacción- es una conveniente herramienta para ayudar a aclarar el papel de NR4A1 en la muerte autofágica.

Dicha estrategia, además, permitiría bloquear la acción de la proteína endógena, limitando el efecto en su conformación sin alterar su composición, propiedades que afecten su función, ni su estructura. El uso de mutantes dominantes negativas para el dominio de unión al DNA podría afectar gravemente la estructura de la proteína, y por tanto, su funcionalidad, además de que dichas mutantes tendrían que competir efectivamente con la proteína endógena para obtener el efecto de silenciamiento deseado. Adicionalmente, se ha observado que al realizar mutaciones en su dominio de unión al DNA, NR4A1 tiende a salir del núcleo, poniendo de manifiesto la importancia de utilizar un método que minimice las alteraciones provocadas a dicho receptor nuclear.

El hallazgo del motivo de unión como dímero de NR4A1 en la secuencia más enriquecida en la tercera ronda de selección de la biblioteca Bank20 es alentador, pues es un indicador de que el proceso de selección realizado encontró ligandos de forma efectiva. Otros oligómeros que también se encontraron enriquecidos, cuyas secuencias no coinciden ni contienen elementos semejantes a NuRE o NBRE también se encontraron enriquecidos, y se perfilan como candidatos con una potencial buena afinidad que podría competir con la secuencia endógena reconocida por NR4A1.

Sin embargo, a pesar de que la técnica de SELEX ha sido empleada exitosamente para obtener aptámeros de alta afinidad y especificidad (Stoltenburg 2007), a la fecha existen muy pocos reportes donde se hayan utilizado exitosamente con el fin de competir con la unión al dominio de unión al DNA del factor de transcripción blanco (Cho 2004) e inhibir exitosamente su actividad transcripcional (Zhao 2006), por lo que será necesario demostrar su funcionalidad.

CONCLUSIONES.

La cinasa mTOR no se activa durante la progresión de la muerte autofágica, aunque no se observó un decremento en los niveles intracelulares de ATP, lo cual puede reflejarse en la falta de activación observada en el caso de AMPK. En relación con la interacción de NR4A1 con p53, la expresión de DRAM se incrementó ligeramente durante la muerte celular. Por lo tanto, el mecanismo por el cual NR4A1 promueve la muerte autofágica puede estar relacionado con la transcripción de otros genes; la obtención de aptámeros afines al dominio de unión al DNA de NR4A1 representa una herramienta para inhibir su unión a los genes blanco, lo que permitirá determinar si su actividad transcripcional es crucial para la progresión de la muerte celular autofágica.

PERSPECTIVAS.

La ausencia de un declive en los niveles de ATP durante la muerte autofágica necesita ser verificada por medio de mediciones realizadas en tiempos más tempranos tras la inducción de muerte; además, la adición de un parámetro que refleje el estado metabólico de la célula en los diferentes tiempos analizados (como pudiera ser la expresión de genes relacionados con el metabolismo, como GAPDH) sería una forma conveniente de normalizar las fluctuaciones energéticas propias del ciclo celular dentro de nuestro modelo experimental. Sin embargo, aún falta comprobar de manera directa, por medio de RT-PCR, si existe inducción de los genes G6pc, Fbp1, Fbp2 y Eno3, relacionados con el metabolismo de la glucosa, en nuestro modelo de muerte autofágica.

Ya que la detección de DRAM por medio de Western blot resulta problemática y los resultados obtenidos son difícilmente reproducibles, se propone cambiar de estrategia al implementar la detección de su mensajero usando RT-PCR, para ver si existe una activación de DRAM tras la inducción de la muerte autofágica.

En caso de que la inducción de los genes gluconeogénicos o de DRAM tras la inducción de la muerte autofágica sea confirmada, podrá procederse a la validación de su participación en la muerte, utilizando RNA de interferencia para silenciar su expresión en el contexto del modelo de NK₁R/SP. Utilizando esta misma estrategia, podría determinarse su importancia en los otros modelos donde se ha validado la participación de NR4A1 como mediador indispensable para la progresión de la muerte autofágica (sobre expresión de IGF1R en células HEK293, inhibición de

caspasas en fibroblastos L929). En caso de obtener resultados positivos, se requeriría determinar si dichos genes se inducen en el modelo de muerte autofágica, cuando NR4A1 ha sido silenciado o inhibido.

Finalmente, se requiere confirmar la unión e inhibición de la actividad transcripcional de NR4A1 por los aptámeros seleccionados. La unión a NR4A1 de los aptámeros seleccionados será validada por medio de geles de retardamiento y medición de interacciones en tiempo real utilizando SPR (Surface Plasmon Resonance). La capacidad de los aptámeros seleccionados para inhibir la actividad transcripcional de NR4A1 se confirmará utilizando un gen reportero acoplado a la secuencia reconocida por NR4A1. Se realizará el mismo ensayo utilizando Nurr1, un miembro cercano de la familia NR4A, que reconoce la misma secuencia que NR4A1, para definir la especificidad de la inhibición por parte de los oligómeros seleccionados. Una vez validada la unión e inhibición de la actividad transcripcional de los aptámeros obtenidos por medio de la selección, dichos aptámeros serán transfectados en el modelo de muerte autofágica de NK₁R/SP, para así determinar si la muerte se ve impedida.

REFERENCIAS.

- Castedo, M., K. F. Ferri, et al. (2002). "Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Pro- and Anti-Apoptotic." Cell Death and Differentiation **9**(2): 99-100.
- Castro-Obregon, S., G. del Rio, et al. (2002). "A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death." Cell Death and Differentiation **9**: 807-817.
- Castro-Obregon, S., R. V. Rao, et al. (2004). "Alternative, Nonapoptotic Programmed Cell Death." Journal of Biological Chemistry **279**(17): 17543-17553.
- Castro, A. F., J. F. Rebhun, et al. (2003). "Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation- dependent manner." Journal of Biological Chemistry **278**: 32493–32496.
- Crichton, D., S. Wilkinson, et al. (2006). "DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis." Cell **126**: 121–134.
- Crichton, D., S. Wilkinson, et al. (2007). "DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death." Autophagy **3**(1): 72-74.
- Cuervo, A. M. (2004). "Autophagy: in sickness and in health." Trends on Cell Biology **14**(2): 70-77.
- Chen, N., Debnath, J. (2010). "Autophagy and tumorigenesis." Journal of the Federation of European Biochemical Societies **584**(1427–1435).
- Cho, J. S., Lee, Y.J., Shin, K.S., Jeong, S., Park, J., Lee, S.W. (2004). "In vitro Selection of Specific RNA Aptamers for the NFAT DNA Binding Domain." Molecules and Cells **18**(1): 17-23.
- Di Fonzo, A., D. Ronchi, et al. (2009). "The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency." Am J Hum Genet **84**(5): 594-604.
- Eells, J. B., Witt, J., Otridge, J. B., Zuffova, E. and Nikodem, V. M. (2000). "Structure and Function of the Nur77 Receptor Subfamily, a Unique Class of Hormone Nuclear Receptors." Current Genomics **1**: 135-152.
- Faivre, S., G. Kroemer, et al. (2006). "Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents." Nature Reviews - Drug Discovery **5**: 671-688.
- Feng, Z., H. Zhang, et al. (2005). "The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(23): 8204-8209.
- Ferbus, D., C. Bovin, et al. (2003). "The zinc finger protein OZF (ZNF146) is overexpressed in colorectal cancer." J Pathol **200**(2): 177-82.
- Fu, Y., L. Luo, et al. (2007). "NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance." Journal of Biological Chemistry **282**: 31525–31533.
- Gozuacik, D. and A. Kimchi (2007). "Autophagy and cell death." Current Topics on Developmental Biology **78**: 217-245.
- Hardie, G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nature Reviews - Molecular Cell Biology **8**: 774-785.
- Huang, Q., Raya, A., DeJesus, J., Chao, S., Quon, K.C. and Peter G. Schultz (2003). "Identification of p53 regulators by genome-wide functional analysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(10): 3456–3461.
- Kastner, P., M. Mark, et al. (1995). "Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?" Cell **83**: 859–869.

- Kim, S. O. (2003). "Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death." *J of Exp Med* **197**(11): 1441-1452.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy." *Developmental Cell* **6**: 463–477.
- Liang, B., X. Song, et al. (2007). "Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis." *Exp Cell Res* **313**(13): 2833-44.
- Lin, B., S. K. Kolluri, et al. (2004). "Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3." *Cell* **116**(4): 527-40.
- Maiuri, M. C., S. A. Malik, et al. (2009). "Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2." *Cell Cycle* **8**(10): 1571-6.
- Mathew, R. (2007). "Autophagy supresses tumor progression by limiting chorosomal instability." *Genes & Development* **21**(11): 1367-1381.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2008). "Nutrient sensing: TOR's Ragtime." *Nature Cell Biology* **10**(8): 881-882.
- Meley, D., C. Bauvy, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis." *Journal of Biological Chemistry* **281**(46): 34870-34879.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, et al. (2010). "Methods in mammalian autophagy research." *Cell* **140**(3): 313-26.
- Moll, U., N. Marchenko, et al. (2006). "p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction." *Oncogene* **25**(34): 4725-4743.
- Ogier-Denis, E. and P. Codogno (2003). "Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer." *Biochim Biophys Acta* **1603**(2): 113-28.
- Pattingre, S., A. Tassa, et al. (2005). "Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy." *Cell* **122**: 927–939.
- Pei, L., H. Waki, et al. (2006). "NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism." *Nature Medicine* **12**: 1048–1055.
- Philips, A., S. Lesage, et al. (1997). "Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells." *Molecular Cell Biology* **17**(5946–5951).
- Philips, A., M. Maira, et al. (1997). "Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription." *Mol Cell Biol* **17**(10): 5952-9.
- Qu, X., J. Yu, et al. (2003). "Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene." *Journal of Clinical Investigation* **112**: 1809–20.
- Shepherd, P. R. and B. B. Kahn (1999). "Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus." *New England Journal of Medicine* **341**: 248–257.
- Shimizu, S., T. Kanaseki, et al. (2004). "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes." *Nature Cell Biology* **6**: 1221-1228.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B. (2007). "SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands." *Biomolecular Engineering* **24**: 381–403.
- Suzuki, S., N. Suzuki, et al. (2003). "Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8276-80.
- Tasdemir, E., C. Maiuri, et al. (2008). "Regulation of autophagy by cytoplasmic p53." *Nature Cell Biology* **10**(6): 676-687.
- Tooze, S. A., Yoshimori, T. (2010). "The origin of the autophagosomal membrane." *Nature Cell Biology* **12**(9): 831-835.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2005). "Another way to die: autophagic programmed cell death." *Cell Death and Differentiation* **12**: 1528–1534.
- Vousden, K. H. (2000). "p53: death star." *Cell* **103**: 691–694.

- Vousden, K. H. and D. P. Lane (2007). "p53 in health and disease." Nature Reviews - Molecular Cell Biology **8**: 275-283.
- Wei, M. C., W.-X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death." Science **292**: 727-730.
- Winoto, A. and D. R. Littman (2002). "Nuclear hormone receptors in T lymphocytes." Cell **109 Suppl**: S57-66.
- Wong, E., Cuervo, A.M. (2010). "Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases." Nature Neuroscience **13**(7): 805-811.
- Wu, S., Z. P. Zhang, et al. (1997). "Reduction of both RAR and RXR levels is required to maximally alter sensitivity of CA-OV3 ovarian tumor cells to growth suppression by all-trans-retinoic acid." Exp Cell Res **237**(1): 118-26.
- Xu, Y., S. O. Kim, et al. (2006). "Autophagy Contributes to Caspase-independent Macrophage Cell Death." Journal of Biological Chemistry **281**(28): 19179–19187.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Eaten alive: a history of macroautophagy." Nat Cell Biol **12**(9): 814-22.
- Yue, Z., S. Jin, et al. (2003). "Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 15077–82.
- Zhan, Y., X. Du, et al. (2008). "Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77." Nature Chemical Biology **4**(9): 548-556.
- Zhao, B.-x., H.-z. Chen, et al. (2006). "p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3." The EMBO Journal **25**: 5703–5715.
- Zhao, X., Shi, H., Sevilimedu, A., Liachko, N., Nelson, H.C.M., Lis, J.T. (2006). "An RNA aptamer that interferes with the DNA binding of the HSF transcription activator." Nucleic Acids Research **34**(13): 3755–3761.