



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL IPN

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA
MOLECULAR

**“Papel de la fosforilación en la localización subcelular
del receptor nuclear Nurr1 en macrófagos humanos
M1 activados con estímulos inflamatorios”**

TESIS

Que presenta:

I.B.Q. EDUARDO SANTANA CISNEROS

Para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de:
BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de la tesis:

DRA. MARÍA CARMEN SÁNCHEZ TORRES

Ciudad de México

Agosto, 2020

AGRADECIMIENTOS

- Primeramente, al CINVESTAV por brindarme la oportunidad de realizar la maestría en sus instalaciones.
- Al CONACYT por el apoyo económico recibido en el transcurso de la maestría.
- Al banco de Sangre del Centro Médico Nacional “La Raza” y al Centro Nacional de Transfusión Sanguínea por la donación de muestras empleadas para realizar el proyecto.
- A la Dra. Carmen Sánchez por brindarme la oportunidad de formar parte de su gran equipo de trabajo, por su paciencia, orientación y por compartirme parte de su conocimiento.
- A mis asesores: Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete y el Dr. Nicolas Villegas Sepúlveda por su orientación y consejos.
- A la Dra. Norma Cristina Segovia Gamboa por ayudarme y asesorarme en el desarrollo de metodologías.
- A todos los profesores del Departamento de Biomedicina Molecular por su apoyo y disposición que presentaron en todo momento.
- A mis compañeros de laboratorio: Ramon, Miguel y Obed por sus apoyos, consejos y principalmente su amistad.
- A mis compañeros de generación por brindarme su amistad, apoyo y buenos momentos.
- A María de Jesús Maqueda Villegas por su constante apoyo y orientación.
- A mis padres y hermanos, por su constante apoyo en todas las decisiones que he tomado y por siempre estar para mí en todo momento.
- A mi novia Dayan, por estar siempre conmigo dándome su apoyo incondicional en todo momento y por su cariño y amor que me brinda día a día, Te amo.

INDICE

1	ANTECEDENTES.....	7
1.1	Proceso inflamatorio	7
1.2	Macrófagos	8
1.3	Macrófagos en la inflamación	8
1.3.1	Activación de macrófagos	10
1.3.2	Factores de transcripción asociados a la activación de los macrófagos	11
1.4	Receptores Nucleares	13
1.4.1	Subfamilia de receptores nucleares NR4A.....	14
1.5	NR4A2/Nurr1	16
1.5.1	Papel de NR4A2/Nurr1 en procesos inflamatorios.....	16
1.5.2	Efecto de NR4A2/Nurr1 sobre la actividad de p65	17
1.5.3	Regulación de la actividad de NR4A2/Nurr1	18
2	ANTECEDENTES DIRECTOS.....	24
2.1	Expresión diferencial de Nurr1 en macrófagos polarizados M1 y M2.....	24
2.2	Nurr1 como regulador negativo de la función inflamatoria en los macrófagos M1	24
2.3	Nurr1 se relocaliza a nivel nuclear tras el estímulo con PGE ₂	25
3	JUSTIFICACIÓN.....	27
4	HIPOTESIS	27
5	OBJETIVO GENERAL	28
5.1	OBJETIVOS PARTICULARES	28
6	MATERIALES Y METODOS.....	29
6.1	Aislamiento de monocitos	29
6.2	Generación de macrófagos M1	29
6.3	Ensayos de inmunofluorescencia	29
6.4	Ensayos de Western blot	30
7	RESULTADOS.....	31
8	DISCUSION.....	42
9	CONCLUSIONES	45
10	PERSPECTIVAS.....	46
11	REFERENCIAS.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso inflamatorio.	8
Figura 2. Diferenciación y distribución de fagocitos mononucleares	9
Figura 3. Citocinas producidas por células inmunes pueden dar lugar a	11
Figura 4. Dominios funcionales de los RNs.....	13
Figura 5. Receptores NR4A, sus homologías y dominios.....	15
Figura 6. Elementos de respuesta NR4A	16
Figura 7. Efecto de la estimulación con LPS sobre la interacción de Nurr1 y p65 en células BV2.	17
Figura 8. Modelo de la represión de p65 mediada por Nurr1/CoREST	18
Figura 9. La fosforilación de Nurr1 por ERK2 induce una mayor expresión de TH.....	19
Figura 10. p38 potencia a NR42A mediante fosforilación.	20
Figura 11. Los sitios NLS1 y NLS2 se requieren para la localización nuclear y los NES1 y NES2 para su localización citoplasmática	21
Figura 12. Distintos estímulos inducen una relocalización subcelular de Nurr1	22
Figura 13. La fosforilación de Nurr1 por p38 es necesaria para que pueda ser transportado al citoplasma	23
Figura 14. Expresión de Nurr1 en macrófagos polarizados M1 y M2.....	24
Figura 15. Nurr1 es un regulador negativo de la función inflamatoria en los macrófagos GM	25
Figura 16. Nurr1 se relocaliza a nivel nuclear tras estimuló con PGE ₂	26
Figura 17. Distribución subcelular de Nurr1 en condiciones basales	31
Figura 18. La distribución subcelular de Nurr1 es alterada por estímulos inflamatorios	35
Figura 19. IL-10 incrementa la expresión de Nurr1.....	35
Figura 20. El estímulo con CDIM12 provoca un aumento de Nurr1 en el compartimento nuclear	38
Figura 21. El estímulo con CDIM12 provoca un aumento global en la expresión de Nurr1.....	38
Figura 22. La estaurosporina inhibe la alteración de la localización subcelular de Nurr1 en respuesta a estímulos inflamatorios	41

ABREVIATURAS

AF: Activation Function

CoREST: REST corepressor 1

DBD: DNA Binding Domain

FGF: Fibroblast Growth Factor

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

IL: Interleukin

IRF: Interferon Response Factor

LBD: Ligand Binding Domain

LPS: Lipopolysaccharide

MAPK's: Mitogen Activated Protein Kinases

M-CSF: Macrophage colony stima

MyD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88

Mφ: Macrophage

NBRE: Nur Binding Response Element

NES: Nuclear Export Signal

NGF: Nerve Growth Factor

NLR: Nod Like Receptor

NLS: Nuclear Localization Signal

NR: Nuclear Receptor

NR4A: Nuclear Receptor group 4 class A

NurRE: Nur Response Element

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PGE2: Prostaglandina E2

PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

RXR: Retinoid X Receptor

SP1: Specificity Protein 1

Th: T helper

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

RESUMEN

El proceso inflamatorio está mediado por diversas células del sistema inmune, siendo los macrófagos una de las más importantes, ya que están presentes en el inicio, perpetuación y resolución de la inflamación. Los macrófagos que contribuyen al inicio y perpetuación de la inflamación son de tipo M1, mientras que los de tipo M2 son esenciales para los procesos de resolución de la misma. Los macrófagos son capaces de reconocer y activarse por diversos estímulos, lo que conlleva a la activación de diversos genes que ayudan al desarrollo y resolución de la inflamación. Existen muchos factores de transcripción que están involucrados en la respuesta de los macrófagos a los estímulos. Por medio de microarreglos de expresión identificamos genes expresados diferencialmente en macrófagos generados *in vitro* con GM-CSF (macrófagos de tipo M1) y M-CSF (macrófagos de tipo M2) a partir de monocitos CD14+. Dentro de los genes expresados diferencialmente, los macrófagos M1 expresaron niveles incrementados del gen *NR4A2* que codifica para el factor de transcripción Nurr1, el cual ha sido relacionado con procesos de supervivencia, diferenciación, metabolismo y, recientemente, con la inflamación. Nurr1 pertenece a una familia de receptores nucleares huérfanos, por lo que su regulación se da principalmente a nivel transcripcional, por modificaciones postraduccionales y por su localización. En este trabajo analizamos la localización de Nurr1 en macrófagos M1 diferenciados *in vitro* en condiciones basales y tras ser sometidos a estímulos inflamatorios de tipo 1 y 2 (LPS, TNF, IL-4) o anti-inflamatorios (IL-10). En condiciones basales Nurr1 se localizó principalmente en el núcleo celular. LPS indujo un aumento de su localización en el compartimento citoplásmico a tiempos tempranos (1-3 h) y un retorno a los niveles basales a tiempos más tardíos (10 h). IL-10 no provocó cambios sustanciales en la localización subcelular de Nurr1, mientras que TNF e IL-4 indujeron una acumulación nuclear de este receptor a tiempos tardíos de estimulación (10 h). Además, el pre-tratamiento de los macrófagos con estaurosporina, un inhibidor de proteínas cinasas, abatió los efectos producidos por LPS y TNF, sugiriendo que alguna cinasa podría estar involucrada en el cambio de localización de Nurr1 producido por estímulos inflamatorios. Por otro lado, se comprobó que el uso del agonista específico de Nurr1 CDIM12 incrementó su expresión a nivel nuclear, sugiriendo que la alteración en su localización podría estar relacionada con el proceso de activación de Nurr1.

ABSTRACT

The inflammatory process is mediated by various cells of the immune system, with macrophages being one of the most important, since they are present in the initiation, perpetuation and resolution of inflammation. The macrophages that contribute to the onset and perpetuation of inflammation are of the M1 type, while those of the M2 type are essential for its resolution processes. Macrophages are capable of recognizing and being activated by various stimuli, leading to the activation of various genes that aid in the development and resolution of inflammation. There are many transcription factors that are involved in macrophage response to stimuli. Using expression microarrays, we identified genes differentially expressed in macrophages generated in vitro with GM-CSF (M1-type macrophages) and M-CSF (M2-type macrophages) from CD14 + monocytes. Within differentially expressed genes, M1 macrophages expressed increased levels of the NR4A2 gene encoding the transcription factor Nurr1, which has been linked to processes of survival, differentiation, metabolism and, recently, inflammation. Nurr1 belongs to a family of orphan nuclear receptors, therefore its regulation occurs mainly at the transcriptional level, by post-translational modifications and by its location. In this work we analyze the location of Nurr1 in differentiated M1 macrophages in vitro in basal conditions and after being subjected to type 1 and 2 (LPS, TNF, IL-4) or anti-inflammatory (IL-10) stimuli. Under basal conditions Nurr1 was located mainly in the cell nucleus. LPS induced an increase in its location in the cytoplasmic compartment at early times (1-3 h) and a return to baseline levels at later times (10 h). IL-10 did not cause substantial changes in the subcellular location of Nurr1, while TNF and IL-4 induced a nuclear accumulation of this receptor at late stimulation times (10 h). Furthermore, pre-treatment of macrophages with staurosporine, a protein kinase inhibitor, knocked out the effects produced by LPS and TNF, suggesting that some kinase could be involved in the Nurr1 localization change produced by inflammatory stimuli. On the other hand, it was verified that the use of the specific Nurr1 agonist CDIM12 increased its expression at the nuclear level, suggesting that the alteration in its location could be related to the activation process of Nurr1.

1 ANTECEDENTES

1.1 Proceso inflamatorio

La inflamación es una respuesta adaptativa que es detonada por estímulos nocivos, como infecciones o lesiones de un tejido^{1,2}. Una respuesta inflamatoria controlada es benéfica ya que provee protección contra la infección o lesión, pero se puede convertir en un proceso dañino cuando existe una desregulación.

El proceso inflamatorio mejor caracterizado es el que se ocasiona en infecciones bacterianas, el cual es desencadenado por receptores del sistema inmune como receptores tipo Toll (TLR) y receptores tipo NOD (NLR)³. El reconocimiento inicial lo hacen las células del sistema inmune innato conocidas como macrófagos (M ϕ) residentes de tejido, y conlleva la producción de una gran variedad de mediadores inflamatorios que incluyen citocinas, quimiocinas, agentes vasodilatadores, etc. Todo esto lleva al reclutamiento de leucocitos (principalmente neutrófilos) que al llegar a la zona de daño se activan y se encargan de eliminar al agente infeccioso por medio de la liberación de agentes tóxicos contenidos en sus gránulos como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, catepsina G, elastasa entre otros agentes tóxicos⁴.

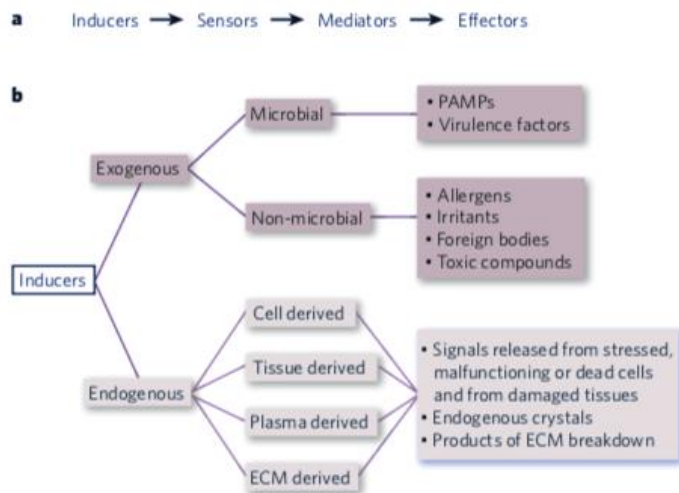


Figura 1. Proceso inflamatorio. (a) un proceso inflamatorio consiste en inductores, sensores, mediadores y efectores. (b) los inductores de la inflamación pueden ser clasificados en endógenos y exógenos, y esos grupos pueden ser clasificados como se muestra. ECM, matriz extracelular; PAMP, patrón molecular asociado a patógenos. Imagen tomada de Medzhitov R (2008)⁵.

Una respuesta inflamatoria exitosa conlleva a la eliminación del agente dañino, seguido por una fase de resolución y reparación que es mediada principalmente por M ϕ s residentes de tejido y M ϕ s reclutados⁶.

1.2 Macrófagos

Los M ϕ s son células fagocíticas pertenecientes al sistema inmune que presentan múltiples roles, tanto en la defensa frente a patógenos y células tumorales, como en el mantenimiento de la homeostasis tisular⁷. Los M ϕ s residentes en los tejidos son células versátiles que están presentes en casi todos los órganos de los mamíferos adultos y contribuyen significativamente tanto al desarrollo de la homeostasis de los tejidos, como a la resolución de la inflamación. Según su origen, los M ϕ s residentes en tejidos pueden clasificarse como M ϕ s derivados de monocitos sanguíneos y M ϕ s residentes con capacidad de autorenovación⁸. En el primer caso, los monocitos derivados de progenitores de médula ósea se convierten en M ϕ s por migración al tejido, después de recibir varios estímulos. En el segundo caso, los M ϕ s residentes en los tejidos se desarrollan a partir de progenitores embrionarios independientemente de las células madre hematopoyéticas y conservan su capacidad de auto-mantenimiento^{8,9}. Estas células pueblan los tejidos antes del nacimiento y proliferan localmente en estado estacionario durante la edad adulta.

1.3 Macrófagos en la inflamación

Los M ϕ s están presentes en todos los tejidos. Ellos se diferencian a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), que migran al tejido en estado estacionario o en respuesta a la inflamación¹⁰. Los M ϕ s en procesos inflamatorios

tienen un papel muy importante ya que son los mayores productores de mediadores inflamatorios en las enfermedades autoinmunes y auto-inflamatorias¹¹.

Cuando un patógeno desencadena la inflamación, los Mφs residentes son estimulados por receptores de reconocimiento de patrones expresados en los Mφs, como parte de la respuesta inmune innata. Estos receptores incluyen la familia TLR y pueden reconocer estructuras moleculares en patógenos microbianos, pero no en células de mamíferos. Las respuestas mediadas por TLR conducen a la activación de NF-κB en asociación con una batería de genes de citocinas proinflamatorias, incluidos IL-1 y TNF-α y quimiocinas que ayudan al reclutamiento de leucocitos, entre ellos monocitos, los primeros monocitos que entran al flujo sanguíneo desde la médula ósea se cree que tienen un fenotipo inflamatorio¹². Estas células pueden salirse rápidamente del flujo sanguíneo y diferenciarse en Mφs o células dendríticas¹³ (**Fig. 2**). Estas células se han identificado como la fuente principal de Mφs inflamatorios en tejidos durante la inflamación o trauma, en donde la migración de monocitos desde el flujo sanguíneo esta aumentada⁹. Debido a que los Mφs activados son los principales productores de tales citoquinas inflamatorias, juegan un papel clave en el inicio de la inflamación.

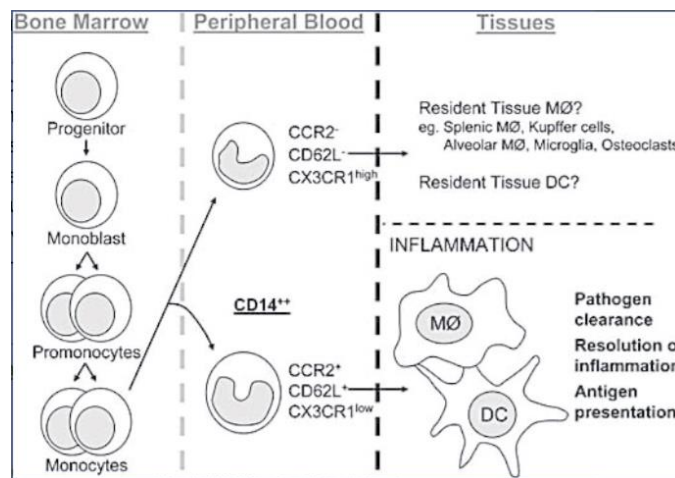


Figura 2. Diferenciación y distribución de fagocitos mononucleares. Se cree que distintas subpoblaciones de monocitos circulantes dan lugar a Mφs tisulares residentes, DC y osteoclastos en comparación con células reclutadas por un estímulo inflamatorio o inmunológico. Imagen tomada de Gordon (2007)¹⁴.

1.3.1 Activación de macrófagos

Los Mφs pueden responder a estímulos endógenos que son rápidamente generados después de una lesión o infección. Estos estímulos son generados por células del sistema inmune innato y generan cambios transitorios en la fisiología de los Mφs, también pueden reaccionar a estímulos producidos por células del sistema inmune adaptativo y provocar un cambio en su fisiología, generalmente estos cambios son a largo plazo¹⁴.

Los Mφs detectan las señales endógenas de daño a partir de sus receptores TLRs, de los cuales muchos de estos receptores transducen las señales gracias a la molécula adaptadora conocida como gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88)¹⁵. La respuesta de Mφs a estímulos endógenos es un ejemplo de muchas de las diferentes formas de desencadenar la activación de Mφs. Los Mφs tienen una plasticidad al momento de cambiar su fisiología, esto para poder responder eficientemente al estímulo que desencadena su activación y puede ser alterada por el sistema inmune innato o adaptativo¹⁶. De esta manera se pueden generar diferentes poblaciones según el estímulo y el microambiente en donde se encuentren (**Fig. 3**).

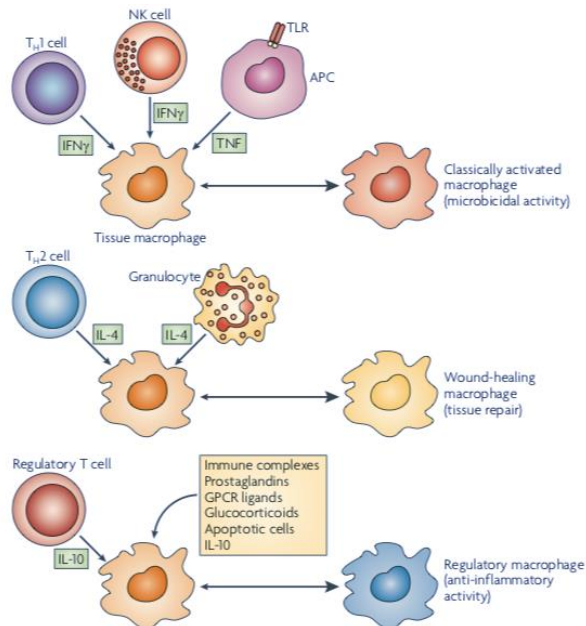


Figura 3. Citocinas producidas por células inmunes pueden dar lugar a Mφs con diferentes fisiologías. Imagen tomada de Mosser & Edwards (2008)¹⁷.

La clasificación más usada de las poblaciones generadas por diversos estímulos son la M1 que fue designada para los Mφs activados clásicamente y M2 para los Mφs activados alternativamente, en donde los Mφ M1 se caracterizan por la secreción de citocinas inflamatorias [interleucina (IL)-1β, factor de necrosis tumoral (TNF), IL-6, IL-12, IL-23] y por su alta capacidad microbicida y tumoricida, y están implicados en el mantenimiento de las respuestas de linfocitos Th1 y Th17 y en la defensa contra patógenos intracelulares. *In vitro* estos Mφ pueden ser generados con el cultivo de monocitos con lipopolisacárido bacteriano (LPS) y con citocinas como interferón (IFN)- γ o factor estimulante de colonias de granulocitos/ Mφ (GM-CSF)¹⁸. Los Mφ M2 están asociados con la resolución de la inflamación, la eliminación de células muertas, la reparación del tejido, la proliferación de diversos tipos celulares (endotelios, fibroblastos), y la angiogénesis. Estos Mφ modulan las respuestas de linfocitos Th2, y están involucrados en la defensa frente a parásitos. Pueden ser generados *in vitro* con citocinas de tipo Th2 (IL-4/IL-13), así como con factores inmunosupresores (IL-10, factor estimulante de colonias de Mφ M-CSF), y secretan principalmente citocinas anti-inflamatorias (IL-10, antagonista del receptor de IL-1 -IL-1Ra-), así como diversos factores de crecimiento (PDGF, FGF, VEGF)^{9,19,20}.

1.3.2 Factores de transcripción asociados a la activación de los macrófagos

Los Mφs son mediadores cruciales en las respuestas inflamatorias y los TLRs son los inductores mejor caracterizados de la inflamación. La respuesta a estos estímulos induce (o reprime) la expresión de miles de genes en los Mφs que conlleva a una activación de los macrófagos^{21,22}. Los conjuntos de genes regulados codifican programas funcionales que controlan la migración de la célula, reparación de tejido y remodelación, defensa anti-microbiana, fagocitosis, reprogramación metabólica y la regulación de la respuesta inmune adaptativa. Estos conjuntos de

genes son regulados por factores de transcripción que pueden ser clasificados en 3 categorías con base a su modo de activación y su función²³.

Los factores de la clase 1 consisten en aquellos factores que están constitutivamente expresados en muchos tipos celulares y son activados por señales dependientes de modificaciones post-traduccionales, es decir, estos factores de transcripción en estado basal se encuentran retenidos en el citoplasma y su activación conlleva a su translocación al núcleo para que pueda ejercer su función. Ejemplos muy caracterizados de esta clase de factores son NF- κ B, factores regulados por interferón (IRFs) y proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP 1 (CREB1) que son encargados de regular genes que se conocen como genes de respuesta primaria²³.

Los factores de clase II son sintetizados de Novo después de la estimulación con LPS y se estima que son aproximadamente 50 proteínas los que conforman esta clase de factores de transcripción. Estos factores de transcripción regulan las ondas subsecuentes de expresión génica después de los genes de respuesta primaria, y pueden hacerlo durante un período prolongado de tiempo²². Un ejemplo muy caracterizado es el CCAAT/ enhancer-binding protein- δ (C/EBP δ)²⁴.

Los factores de transcripción de clase III consisten en reguladores transcripcionales específicos de tipo celular, que en los M ϕ s cambian durante su proceso de diferenciación. Algunos miembros de esta clase de factores de transcripción incluyen a SPI1, C/EBP δ e IRF8^{25,26}. Estas proteínas se convierten en proteínas constitutivamente expresadas en M ϕ s, además en M ϕ s maduros se sabe que esos factores de transcripción median la respuesta celular específica a estímulos inflamatorios²³.

Los fenotipos de los M ϕ s además de ser influenciados por señales que resultan de la activación de receptores de la superficie celular también son influenciados por señales intra o extracelulares que regulan a miembros de la súper-familia de receptores nucleares. Muchos miembros de esta familia de receptores, incluyendo el receptor de glucocorticoides, PPAR- γ y los receptores x del hígado, pueden regular la actividad transcripcional de NF- κ B y otros factores de transcripción pro-inflamatorios a través de mecanismos directos o indirectos²⁷.

1.4 Receptores Nucleares

Los receptores nucleares (NRs) son una familia de factores de transcripción activados por ligando constituidos en humanos por 48 receptores nucleares diferentes que comparten una estructura similar, pero con funciones diferentes, sin embargo, algunas funciones se superponen²⁸ y alrededor de 28 están asociados con macrófagos²⁹. Los NRs juegan un papel muy importante en la homeostasis, metabolismo, reproducción y desarrollo normal³⁰. Además, estos también se han ligado a ciertas enfermedades crónico-degenerativas como cáncer, inflamación y algunas enfermedades neurodegenerativas^{31,32}. Además, se conoce que la expresión de estos factores de transcripción es dependiente del tipo de tejido y del contexto celular.

Desde el punto de vista estructural, los NRs comparten una estructura similar (**Fig. 4**). Poseen de cinco a seis dominios funcionales denominados con las letras de la A-F, en donde la región N-terminal contiene la región de transactivación AF-1, esa región interactúa de manera independiente de ligando con co-factores y algunas otras proteínas que forman parte de la maquinaria de transcripción. La región C consiste en el dominio de unión al DNA (DBD) y la región D que se encuentra entre la región C y E funciona como una secuencia de localización nuclear mientras que la región E contiene el dominio de transactivación AF-2 que es dependiente de ligando y puede funcionar sinérgicamente con el dominio de transactivación AF-1^{33,34}. Algunos NRs presentan lo que es una región F que se encuentra relacionada con la modulación de la actividad³⁵.

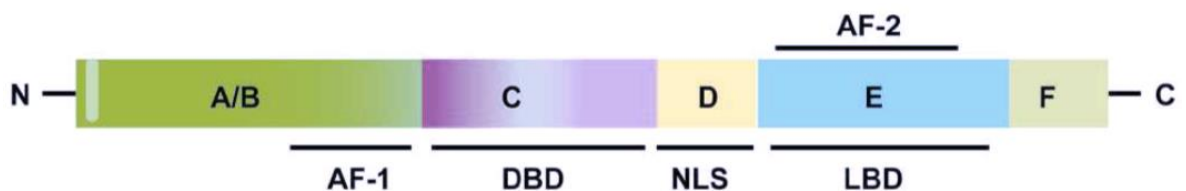


Figura 4. Dominios funcionales de los NRs. Imagen tomada de Ortega-Domínguez, *et al.* (2015)³³.

Los NRs se han clasificado en 3 grupos: receptores convencionales de hormonas esteroidea/tiroidea tales como el receptor de glucocorticoides y de progesterona, receptores huérfanos adoptados (receptores que no se les conocía el ligando endógeno) como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas [PPARs], y los receptores de retinoide X [RXRs]²⁴ y finalmente los receptores huérfanos (receptores que no se conoce su ligando endógeno) como lo son los receptores de la familia NR4A³⁶.

1.4.1 Subfamilia de receptores nucleares NR4A

NR4A1 (Nur77)³⁷, NR4A2 (Nurr1)³⁸ y NR4A3 (NOR-1)³⁹ comprenden un subgrupo de receptores nucleares huérfanos identificados inicialmente como genes de respuesta inmediatamente temprana, inducidos en células PC12 en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF)⁴⁰. Sin embargo, se ha descrito que los miembros de este subgrupo de RNs se encuentran expresados en una gran variedad de tejidos como el músculo esquelético, cerebro, corazón, riñón y células T y, además, se ha demostrado que estos genes también son inducidos en otros tipos celulares que han sido expuestos a diferentes estímulos de estrés⁴¹.

Con respecto a su estructura, en la **Fig. 5** se muestra la estructura de los 3 miembros de este subgrupo de RNs en donde se observa que presentan una estructura clásica de los RNs con una homología entre sí del 97% en la región en donde se encuentra el DBD, esto se correlaciona con el hecho de que todos los miembros de este subgrupo de RNs se unen a un elemento de respuesta en el DNA conocido como Elemento de Respuesta a NFGI-B (NBRE), además de que las regiones A/B, E y F corresponden a regiones con menor homología entre sí que va desde 60-65% en las regiones E y F a 20-30% en la región A/B.

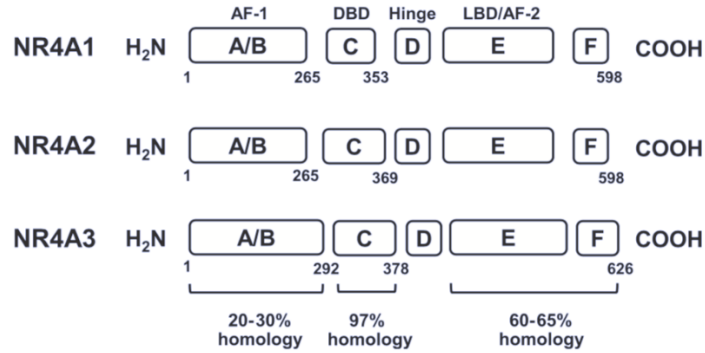


Figura 5. Receptores NR4A, sus homología y dominios. Las homología de secuencia para NR4A1, NR4A2 y NR4A3 varía desde un 97% (DBD), 60-65% (E/F) a 20-30% (A/B). Imagen tomada de Safe, Ook, Meng and Zhou, (2015).

Este subgrupo de RNs puede unirse al DNA de diferentes formas y en distintos motivos de unión (**Fig. 6**), en forma de monómeros al elemento de respuesta NBRE el cual es un octanucleotido en donde se unen los miembros de NR4A como monómeros o dímeros⁴². El blanco transcripcional de los homodímeros de NR4A es llamado Elemento de respuesta a Nur (NurRE) que es un repetido invertido de NBRE⁴³. Además, Nurr1 y Nurr77, pero no NOR-1 son capaces de heterodimerizar con el Receptor X Retinoide (RXR) y unirse a un motivo de unión DR5 que comprende 2 repetidos invertidos del motivo de unión de consenso de RNs separados por 5 nucleótidos⁴⁴.

- A. Monomers**
 NBRE AAAGGTCA
- B. Homodimers/NR4A heterodimers**
 NurRE (POMC) $\overleftarrow{\text{TGATATTTACCTCCAAATGCCA}} \overrightarrow{\text{}}$
- C. Heterodimers with RXR**
 DR5 $\overleftarrow{\text{GGTTCACCGAAAGGTCA}} \overrightarrow{\text{}}$

Figura 6. Elementos de respuesta NR4A. Los miembros de la familia NR4A pueden unirse como monómeros a NBRE (panel A), homodímeros y heterodímeros a NurRE (panel B), o heterodímeros con RXR a el motivo DR5 (panel C). Imagen tomada de Maxwell & Muscat (2006)⁴¹.

1.5 NR4A2/Nurr1

NR4A2 también conocido como Nurr1 es un miembro de la subfamilia de receptores nucleares huérfanos identificado por primera vez mediante un análisis de una biblioteca de cDNA de ratón³⁸. Este receptor nuclear se ha asociado principalmente con el desarrollo y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas (DA)^{45,46}, sin embargo, estudios recientes lo han asociado con diversas funciones biológicas como: la regulación de la homeostasis energética⁴⁷, la diferenciación y mantenimiento de células T reguladoras mediante la inducción de Foxp3⁴⁸, funciones anti-apoptóticas⁴⁹ y regulación de la osteocalcina en osteoblastos⁵⁰. Además, se conoce que Nurr1 es inducido rápido y fuertemente en respuesta a lípidos oxidados, citocinas y patrones moleculares asociados a patógenos, como el LPS⁵¹ por lo que se le ha asociado fuertemente a una función en los procesos inflamatorios.

La subfamilia de Nurr1 aun siendo parte de una superfamilia de receptores nucleares, no se les conoce un ligando endógeno, por lo que a estos receptores se les conoce receptores independientes de ligando, además, por medio de análisis de cristalografía se determinó que la estructura del sitio de unión a ligando de Nurr1 se encuentra en una conformación similar a la que presentan otros RNs que se encuentra interactuando con su ligando⁵², por lo que se creó que su actividad es constitutiva y carece de una regulación mediada por ligando. Por esta razón, La actividad de estos factores de transcripción está estrechamente controlada a nivel de expresión, localización subcelular y modificaciones postraduccionales⁵³.

1.5.1 Papel de NR4A2/Nurr1 en procesos inflamatorios

Los miembros de la subfamilia de receptores nucleares huérfanos NR4A son rápidamente inducidos por mediadores inflamatorios lo que ha sugerido que estos receptores pueden tener un papel importante como mediador transcripcional de la

señalización de citocinas⁵¹, además, han surgido como reguladores clave de citocinas y factores de crecimiento en enfermedades caracterizadas por una prolongada o inapropiada respuesta inflamatoria. Se ha encontrado que la expresión anormal de Nurr1 esta correlacionada con distintos desordenes inflamatorios como en la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, cáncer y Parkinson⁵³⁻⁵⁷. En microglía y astrocitos se ha probado que Nurr1 tiene un papel muy importante reprimiendo genes proinflamatorios y de esta manera protegiendo a las células dopaminérgicas de una muerte inducida por inflamación⁵⁸, además, se ha encontrado que en linfocitos T, Nurr1 es indispensable para la inducción de Foxp3⁵¹ todo esto indicando un papel anti-inflamatorio para Nurr1, sin embargo, también se han encontrado estudios en donde a Nurr1 se le asigna un papel proinflamatorio^{53,54}.

1.5.2 Efecto de NR4A2/Nurr1 sobre la actividad de p65

La regulación de los procesos inflamatorios por Nurr1 se ha asociado con una posible interacción con un mediador muy importante en las respuestas inflamatorias, el factor de transcripción NF-κB. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en células BV-2 de microglía de ratón se ha encontrado que basalmente existe una asociación de Nurr1 con p65 que tras un estímulo con LPS esta interacción incrementa⁵⁶. Se ha estudiado el posible efecto que Nurr1 podría tener sobre la actividad de p65 y se ha reportado que puede ser positiva⁵³ o negativa⁵⁸⁻⁶⁰.

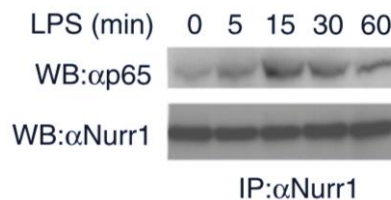


Figura 7. Efecto de la estimulación con LPS sobre la interacción de Nurr1 y p65 en células BV2. Los lisados de células BV2 estimuladas con LPS durante los tiempos indicados se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-Nurr1 y se realizaron ensayos de Western blot con un anticuerpo anti-p65 o anti-Nurr1. Figura tomada de Saijo K, *et al.* (2009)⁵⁸.

Sin embargo, sólo se han propuesto mecanismos sobre cómo Nurr1 ejerce un efecto negativo en la actividad de p65. Un mecanismo propuesto (**Fig. 7**) se basa en la interacción de Nurr1 con la subunidad p65 de NF- κ B que se encuentra en el promotor de sus genes blanco. Nurr1 unido a p65 recluta al complejo CoREST y provoca la disociación de p65 del DNA⁵⁸.

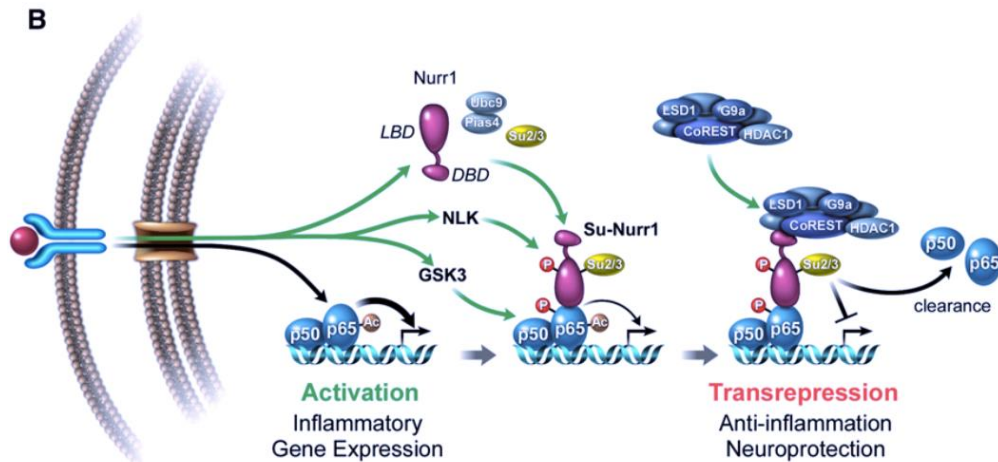


Figura 8. Modelo de la represión de p65 mediada por Nurr1/CoREST. Imagen tomada de Saijo K, *et al.* (2009)⁵⁸.

1.5.3 Regulación de la actividad de NR4A2/Nurr1

La regulación de la actividad de Nurr1 es independiente de ligando, debido a que mediante ensayos de cristalografía de Nurr1 se ha encontrado que su LBD se encuentra en una conformación que le impide una interacción con un ligando⁵². Es por esto por lo que se cree que la regulación de este receptor está dada principalmente a nivel de expresión, modificaciones postraduccionales y localización celular.

Se ha descrito que Nurr1 puede sufrir modificaciones postraduccionales tales como SUMOylaciones y fosforilaciones que pueden afectar su actividad. Se ha reportado que la SUMOylación de Nurr1 esta mayormente asociada a una represión de su actividad transcripcional^{61,62}. Por otro lado, las fosforilaciones sobre Nurr1 han sido asociadas a distintos procesos biológicos tales como aumento de la actividad transcripcional, reparación de DNA, inducción de necrosis o en el aumento de su degradación⁶³⁻⁶⁸. Se han reportado distintas cinasas que se encargan de la

fosforilación de Nurr1, sin embargo, las MAPK's parecen jugar un papel importante debido a que se activan tras una gran variedad de estímulos y estas pueden afectar directamente la actividad de Nurr1^{63-65,67} (**Fig. 9-10**).

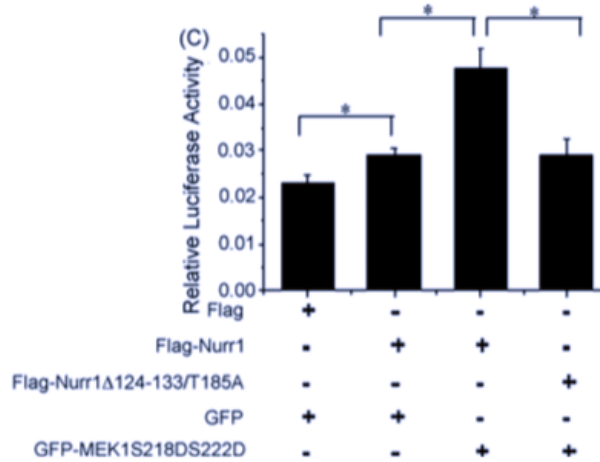
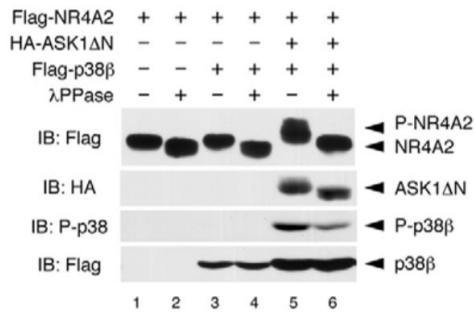
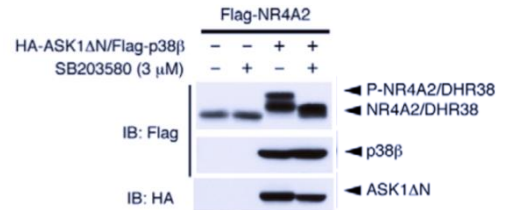


Figura 9. La fosforilación de Nurr1 por ERK2 induce una mayor expresión de TH. Las células HEK293 se transfectaron con 100 ng de pGL3 (TH) -Luci, 200 ng de pFlag-nurr1 o pFlag-Nurr1 \square 124–133 / T185A en presencia o ausencia de pGFP-MEK1S218DS222D. Las células se cosecharon 48 h después de la transfección y los extractos se usaron para ensayos de actividad de luciferasa. Figura tomada de Zhang T, *et al.* (2007)⁶³.

A)



B)



C)

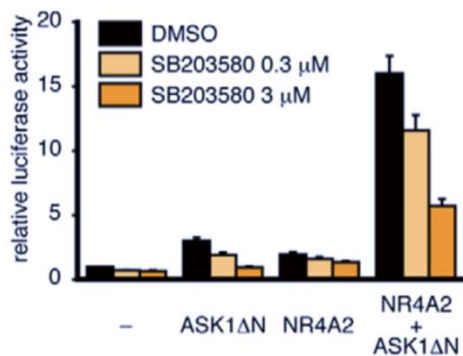


Figura 10. p38 potencia a NR42A mediante fosforilación. (A) Los plásmidos de expresión indicados se transfectaron transitoriamente en células HEK-293. Los lisados celulares se dividieron en dos partes alícuotas: una no se trató y la otra se trató con λ PPasa. Las muestras fueron sometidas a inmunotransferencia. **(B)** Los plásmidos de expresión indicados se transfectaron transitoriamente en células HEK-293. A las 4 h después de la transfección, se añadieron 3 mM de SB203580 al medio de cultivo. Después de otras 24 h, los lisados celulares se sometieron a inmunotransferencia. **(C)** NR4A2 y / o ASK1DN junto con el gen indicador TH / -9kb se expresaron transitoriamente en células PC12. A las 4 h después de la transfección, las concentraciones indicadas de SB203580 se añadieron al medio de cultivo. Después de otras 20 h, se midió la actividad de luciferasa y se indicó como un aumento de veces respecto a la de las células tratadas con DMSO control transfectadas con un vector vacío (columnas negras). Figuras tomadas de Sekine Y, *et al.* (2011)⁶⁴.

Los estudios anteriores sugieren que la fosforilación es una modificación muy importante que puede regular la actividad de Nurr1, sin embargo, se ha reportado que la localización subcelular también es un regulador importante de su actividad. Se ha determinado que en estado basal la localización subcelular de Nurr1 es predominantemente nuclear, esto evaluado en distintos tipos celulares (**Fig. 11A**) y, además, que Nurr1 presenta 2 señales de localización nuclear (NLS) y 2 señales de exportación nuclear (NES) que regulan la localización subcelular de Nurr1⁶⁹ (**Fig. 11B-C**).

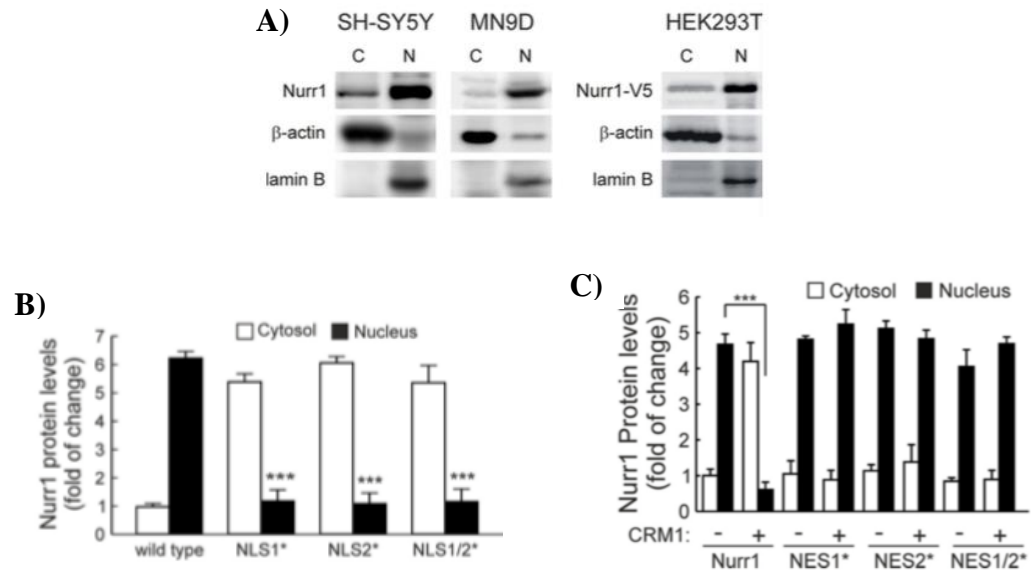


Figura 11. Los sitios NLS1 y NLS2 se requieren para la localización nuclear y los NES1 y NES2 para su localización citoplasmática. (A) Las fracciones citosólicas (C) y nucleares (N) de las líneas celulares dopaminérgicas SH-SY5Y y MN9D muestran la localización subcelular de Nurr1 endógeno y en células HEK293T se muestra la localización subcelular de Nurr1 ectópico. **(B)** Fracciones citosólicas y nucleares de células HEK293T transfectadas con Nurr1, Nurr1-NLS1*, Nurr1-NLS2* y Nurr1-NLS2* de doble mutación. **(C)** Fracciones citosólicas y nucleares de células HEK293T cotransfectadas con vectores de expresión para CRM1 marcado con HA y Nurr1, Nurr1-NES1, Nurr1-NES2 y Nurr1-NES1/2. Figuras tomadas de García-Yagüe AJ, *et al.* (2013)⁶⁹.

Existen diferentes estímulos que son capaces de afectar esta localización. Se ha reportado que el estrés oxidativo^{67,69} (**Fig. 12A**), estímulos proinflamatorios como TNF o LPS^{53,59,60,70} (**Fig.12B**) y el uso de agonistas como CDIM12^{60,70} (**Fig. 12C**) inducen una relocalización subcelular de Nurr1. Se ha reportado que el estrés oxidativo induce una exportación de Nurr1 al citoplasma desencadenando de esta manera la inducción de necrosis^{67,69}. Por otro lado, el uso del agonista de CDIM12 induce una translocación de Nurr1 al núcleo y esto provoca una menor expresión de citocinas inflamatorias tras un estímulo con LPS o TNF^{60,69}.

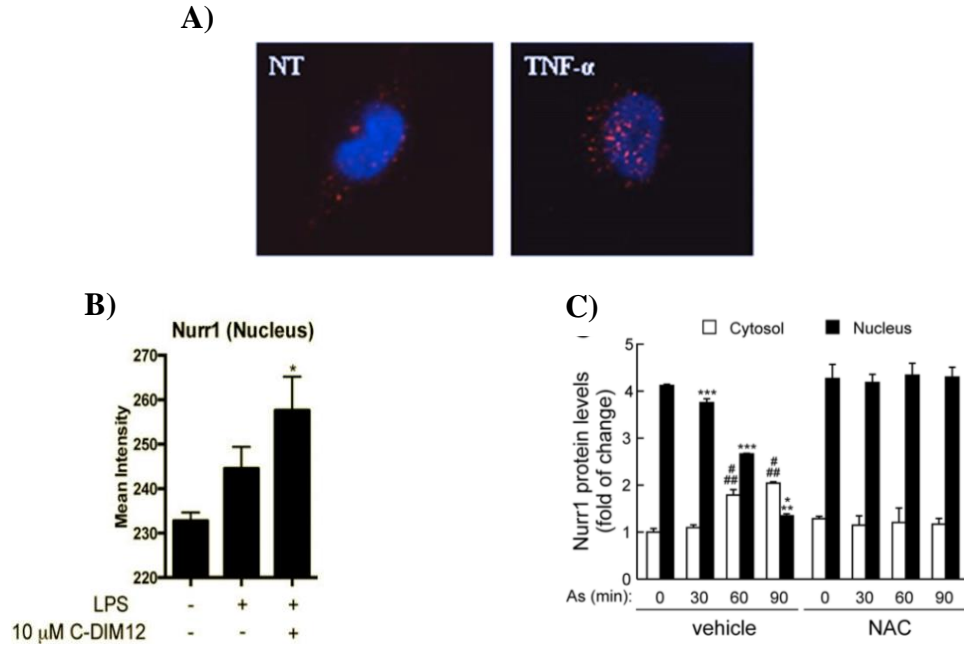


Figura 12. Distintos estímulos inducen una relocalización subcelular de Nurr1. (A) Las células de sinoviocitos K4 IM se dejaron sin tratar (NT) o se trataron durante 1 h con TNF (10 ng / ml). La expresión endógena de NR4A2 se detectó usando un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo Cy3 y los núcleos celulares se tiñeron en contraste usando DAPI. **(B)** Cuantificación de análisis realizado por microscopia confocal. Las células de microglía de ratón se colocaron en placas sobre vidrio de cubierta y se trataron con C-DIM12 10 mM durante 1 h seguido de 1 mg / ml de LPS durante 24 h. **(C)** Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína citosólica y nuclear a partir de transferencias representativas. Las células HEK293T se transfectaron con el vector de expresión para Nurr1-V5, se privaron de suero durante 16 h, y se trataron con vehículo (etanol al 0,1%) o NAC (3 h, 10 mM). Luego, las células se trataron con arsenito de sodio (As, 100 μ M) durante los tiempos indicados. Figuras tomadas de Aherne CM, et al. (2012)⁵³; De Miranda BR, et al. (2015)⁶⁰; García-Yagüe AJ, et al. (2015)⁶⁹.

De esta manera se sabe que Nurr1 tiende a cambiar su localización subcelular tras un estímulo y así regular su actividad. Este fenómeno es dependiente de exportinas e importinas, sin embargo, se sabe que en algunos casos son necesarias las modificaciones postraduccionales para que exportinas o importinas puedan reconocer a su blanco³³. Recientemente se ha descrito microglía de ratón y en

células HeLa que las MAPK's están involucradas en la alteración de la localización de Nurr1 tanto para el importe como para el exporte nuclear^{67,70}.

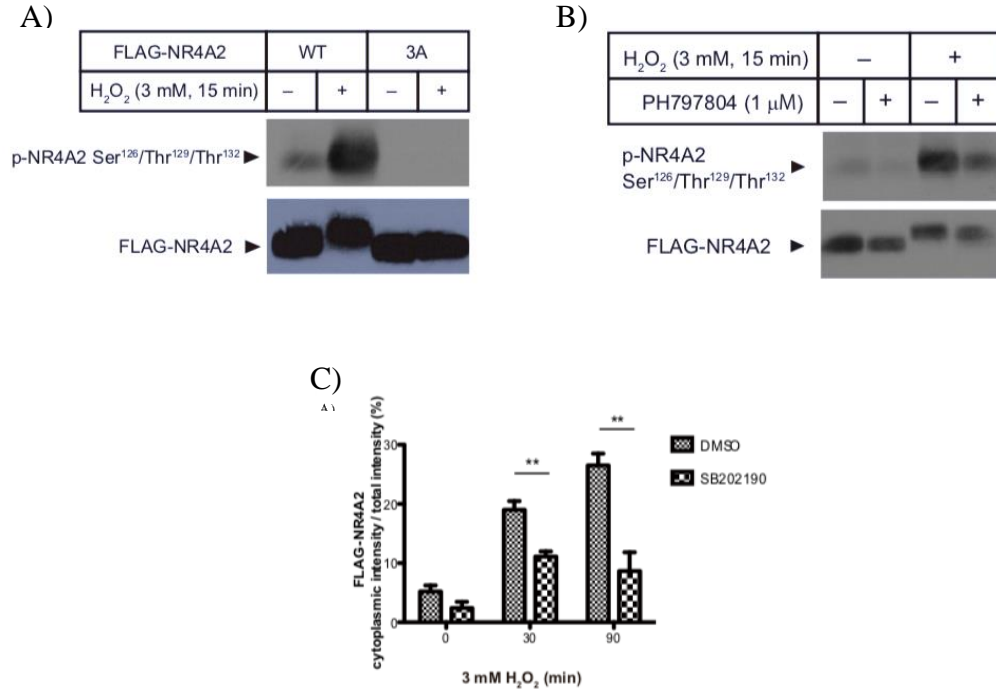


Figura 13. La fosforilación de Nurr1 por p38 es necesaria para que pueda ser transportado al citoplasma. (A) 24 h después de la transfección con los plásmidos de expresión indicados, las células HeLa se trataron con 3 mM H₂O₂ durante 15 min y se sometieron a inmunotransferencia. **(B)** 24 h después de la transfección con FLAG-NR4A2, las células HeLa se trataron con los compuestos inhibidores indicados, y 30 min después, las células se incubaron con 3 mM H₂O₂ durante los períodos de tiempo indicados y se sometieron a inmunotransferencia. **(C)** 48 h después de la transfección con FLAG-NR4A2, las células HeLa que se pre-trataron con SB202190 10 μM durante 30 min se incubaron con 3 mM H₂O₂. Después de los períodos indicados, las células se sometieron a análisis inmunocitoquímico con el anticuerpo anti-FLAG. Las imágenes se monitorizaron mediante microscopía Confocal, y la translocación inducida por H₂O₂ de cada NR4A2 se cuantificó utilizando un analizador de imágenes celulares. Figuras tomadas de Watanabe T, *et al.* (2015)⁶⁷.

2 ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 Expresión diferencial de Nurr1 en macrófagos polarizados M1 y M2

El grupo de investigación del laboratorio ha estudiado la expresión basal de Nurr1 en los M ϕ s M1 y M2 generados in vitro en el laboratorio. En la **Fig. 14** se muestra un Western-blot representativo de un ensayo realizado para visualizar la expresión de Nurr1 a nivel de proteína, encontrándose que Nurr1 presenta una expresión preferencial en los M ϕ s generados mediante cultivo de monocitos sanguíneos con la citocina GM-CSF (M1) y por esta razón se había propuesto que Nurr1 pudiera estar relacionado con perfil inflamatorio de estos M ϕ s.

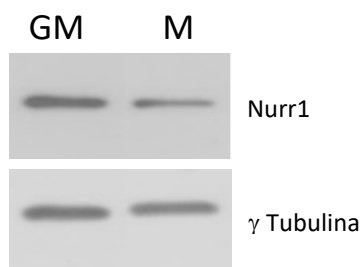


Figura 14. Expresión de Nurr1 en macrófagos polarizados M1 y M2. Los M ϕ s fueron generados mediante el cultivo de monocitos sanguíneos CD14⁺ con las citocinas GM-CSF (GM, M1) o M-CSF (M, M2) durante 6 días. Pasado este tiempo las células se lisaron y se evaluó la expresión de Nurr1 mediante Western blot. La expresión de γ -tubulina se utilizó como control de carga.

2.2 Nurr1 como regulador negativo de la función inflamatoria en los macrófagos M1

Para poder dilucidar la función de Nurr1 en los M ϕ s polarizados se hicieron experimentos de silenciamiento de Nurr1 con un siRNA (**Fig. 15**), midiendo mRNA de marcadores del perfil inflamatorio (*TNF*, *IL1B*, *IL6*, *INHBA*, *CLEC5A*) y del perfil anti-inflamatorio (*IL10*, *CCL2*, *CD163L1*), encontrando que el silenciamiento de Nurr1 provoca un aumento de marcadores del perfil inflamatorio en los M ϕ s M1

generados con GM-CSF, sugiriendo que Nurr1 podría funcionar como un regulador negativo de la función inflamatoria de estos Mφs.

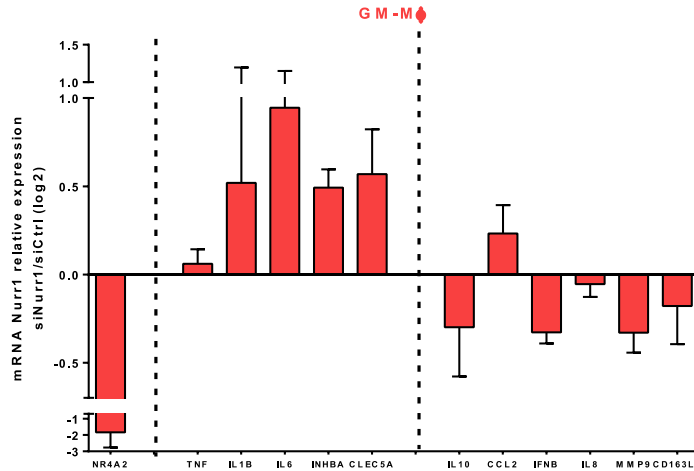


Figura 15. Nurr1 es un regulador negativo de la función inflamatoria en los macrófagos GM. Los Mφs fueron generados mediante el cultivo de monocitos sanguíneos CD14+ con la citocina GM-CSF durante 6 días. En el día 4 de diferenciación se agregó siNurr1 (100 nM). Al día 6 de diferenciación se extrajo el RNA de las células y por RT-PCR cuantitativa se determinó la expresión génica de los marcadores indicados.

2.3 Nurr1 se relocaliza a nivel nuclear tras el estímulo con PGE₂

Además, como se ha probado que la localización subcelular de Nurr1 es importante para su función y que estímulos que inducen su expresión como el LPS y TNF, también provocan una relocalización de Nurr1 en el núcleo^{53,59}. En el laboratorio se decidió evaluar también la localización subcelular de Nurr1 en Mφs polarizados tras un estímulo con PGE₂, mediante inmunofluorescencia (**Fig. 16A**) y Western blot (**Fig. 16B**) debido a que se ha reportado que la PGE₂ es un buen inductor de Nurr1. Se encontró que tras un estímulo con PGE₂ en Mφs GM (M1) Nurr1 tiende a relocalizarse a nivel nuclear siendo a las 3 h después del estímulo la mayor relación nucleó/citoplasma. Debido a que hay reportes que demuestran que la fosforilación es necesaria para una relocalización de Nurr1⁶⁴, se sospecha que esta

relocalización pueda estar mediada por señalizaciones que conlleven a modificaciones postraduccionales, como la fosforilación en Nurr1, que lo lleven a ser reclutado a otro compartimento subcelular.

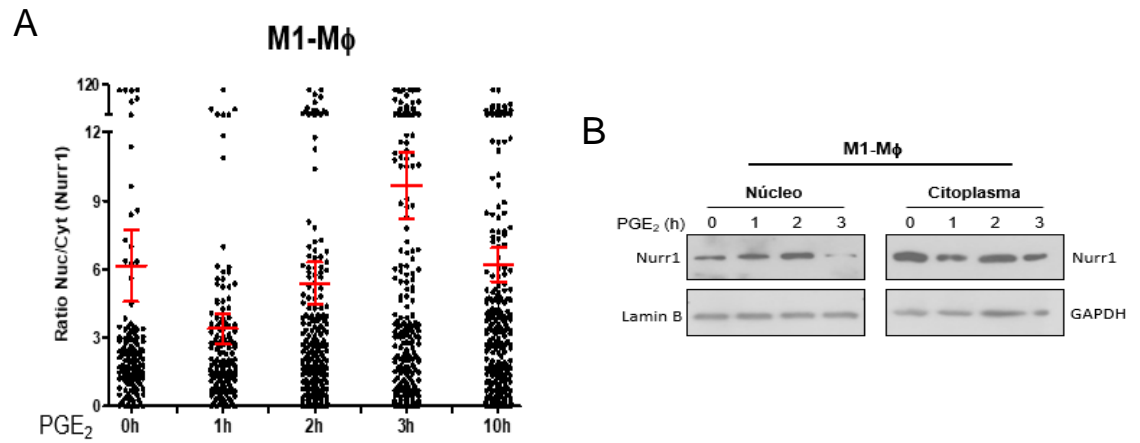


Figura 16. Nurr1 se relocaliza a nivel nuclear tras estímulo con PGE₂. **(A)** Relación de la expresión de Nurr1 entre el núcleo y el citoplasma de los M ϕ M1 en condiciones basales (0 h) y tras 1, 2, 3 o 10 h de estimulación con PGE₂. Cada punto representa el valor de intensidad relativa de fluorescencia de una célula. Barras rojas: valor de la media \pm SEM de la intensidad relativa de fluorescencia. *** $p < 0.0005$. **(B)** Western blot de Nurr1 a nivel citoplásmico y nuclear en los M ϕ M1 y M2 de forma basal (0) y tras el estímulo con 100 ng/ml de PGE₂ después de 1, 2 o 3 h. El control de carga para las fracciones nucleares fue lamin B, y GAPDH para las fracciones citoplásmicas

3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades inflamatorias son uno de los principales problemas a nivel mundial. Los M ϕ s son células inmunes que participan en la iniciación, perpetuación y resolución de los procesos inflamatorios. Dependiendo del microambiente en el que se encuentren los M ϕ s tienden a polarizarse hacia un fenotipo proinflamatorio (M1) o anti-inflamatorio (M2). En las enfermedades crónicas la población predominante de M ϕ s es M1. In vitro, estos M ϕ s presentan una elevada expresión del factor de transcripción Nurr1. Este receptor ha sido asociado con algunas enfermedades inflamatorias crónicas y con la regulación de la secreción de citocinas. El conocimiento de la regulación y de los mecanismos de acción de este factor de transcripción en los M ϕ s podría servir como base para proponer estrategias terapéuticas que tengan como blanco a Nurr1 en procesos inflamatorios.

4 HIPOTESIS

La localización subcelular de Nurr1 depende de procesos de fosforilación en macrófagos humanos activados con estímulos inflamatorios.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la localización subcelular de Nurr1 en macrófagos activados con estímulos pro- y anti-inflamatorios y el papel de la fosforilación en dicha localización.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la localización subcelular de Nurr1 en los macrófagos humanos M1 en condiciones basales.
- 2.- Analizar la modificación de la localización subcelular y de la expresión de Nurr1 en respuesta a estímulos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios.
- 3.- Evaluar el efecto del agonista de Nurr1 CDIM12 en relación a su localización subcelular y su expresión.
- 4.- Determinar el papel de la fosforilación en la modificación de la localización subcelular de Nurr1.

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Aislamiento de monocitos

Los concentrados leucocitarios se obtuvieron de donantes sanos del Banco de Sangre del CMN “La Raza” del IMSS. Las células fueron sometidas a un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/ml). Las células fueron centrifugadas a 2,000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se aislaron las células mononucleares (PBMC) de la interfase entre el Ficoll y el plasma. Los monocitos CD14⁺ fueron purificados por selección positiva mediante MACS (Magnetic Cell Sorting) utilizando un anticuerpo anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec).

6.2 Generación de macrófagos M1

Los monocitos CD14⁺ se cultivaron a una densidad de 0.5×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina y 1% antibióticos. El medio se suplementó con GM-CSF (1000 U/ml, ImmunoTools) para inducir la diferenciación de los monocitos hacia M ϕ s con fenotipo M1. La citocina se adicionó en los días 0, 2 y 4 de cultivo. En el día 6 de diferenciación los M ϕ s se sometieron a diversos estímulos según lo requerido.

6.3 Ensayos de inmunofluorescencia

Los M ϕ s fueron cultivados y diferenciados en placas de 24 pozos colocando previamente en el fondo de cada pozo un cubreobjetos estéril de 13 mm. Una vez alcanzado el sexto día de diferenciación los M ϕ s fueron estimulados con: LPS (100 ng/ml, Sigma-Aldrich), TNF (20 ng/ml, R&D Biosystems), IL-4 (120 U/ml, R&D Biosystems) o IL-10 (40 ng/ml, R&D Biosystems) durante 1, 2, 3 o 10 h. Los M ϕ s control se cultivaron durante esos mismos tiempos en ausencia de los estímulos. Con el fin de determinar si la fosforilación tiene un papel en la modificación de la localización subcelular de Nurr1, los M ϕ s fueron pre-tratados con 10 ng/ml de estaurosporina (Sigma-Adrich) o DMSO 1 h antes de la adición de LPS o TNF. Adicionalmente, los M ϕ s fueron tratados con el agonista de Nurr1 CDIM12 (Sigma-

Aldrich) a las concentraciones de 1 y 10 mM durante 1, 2, 4 y 8 h. Los Mφs control fueron tratados con DMSO.

Una vez terminados los tiempos de estimulación el medio fue retirado, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 3.7% paraformaldehído. Posteriormente se permeabilizaron con Triton X-100 0.3% en PBS durante 15 min y se lavaron con PBS. Las células se trataron con solución de bloqueo (10% IgGs humanas en PBST -0.025%/Triton X-100/PBS-) durante 1 h y a continuación se incubaron con un anticuerpo primario de ratón anti-Nurr1 (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:100, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las células se lavaron con PBST y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FITC (diluido 1:300) durante 1 h. En los últimos 15 min de incubación con el anticuerpo secundario se adicionó faloidina acoplada a TRITC. Por último, los portaobjetos fueron lavados con PBST y montados con VECTASHIELD + DAPI en un portaobjetos. Las células fueron analizadas en un microscopio confocal LEIKA SP8. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de Nurr1 en el núcleo (máscara DAPI) y en el citoplasma (máscara faloidina) de las células fue analizada con el software ImageJ-Fiji (National Institutes of Health).

6.4 Ensayos de Western blot

Los lisados totales de Mφs obtenidos con 5% SDS fueron sonicados y centrifugados a 14,000 rpm por 30 min. El sobrenadante se recuperó y posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína obtenida mediante el kit DC Protein Assay Reagent (BioRad). 30 µg de proteína fue diluida en buffer de carga para su posterior resolución en geles SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con 5% BSA diluida en TBS-T (Tris 0.2 M, NaCl 1.37 M, 0.1% Tween 20) durante 1 h y posteriormente lavadas con TBS-T e incubadas con un anticuerpo primario anti-Nurr1 (Santa Cruz Biotech.) diluido en 1% BSA en TBS-T durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Dako). La reacción se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia ImmunoStar™ (BioRad Laboratories).

7 RESULTADOS

Los estímulos inflamatorios provocan un cambio en la localización subcelular de Nurr1

Con la finalidad de evaluar la localización subcelular de Nurr1 en presencia de estímulos inflamatorios de tipo 1 (TNF y LPS), de tipo 2 (IL-4) y anti-inflamatorios (IL-10), los M ϕ s diferenciados *in vitro* con GM-CSF (M1) se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta de forma basal y tras ser incubados con cada uno de los estímulos mencionados durante 1, 2, 3 y 10 h. Se analizó de forma cuantitativa la intensidad relativa de fluorescencia de Nurr1 en las imágenes de microscopía Confocal en el núcleo y en el citoplasma de los M ϕ s.

En condiciones basales Nurr1 se encontró presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de los M ϕ s. Sin embargo, se detectó una mayor expresión de esta proteína a nivel nuclear en todos los donantes analizados (**Fig. 17**).

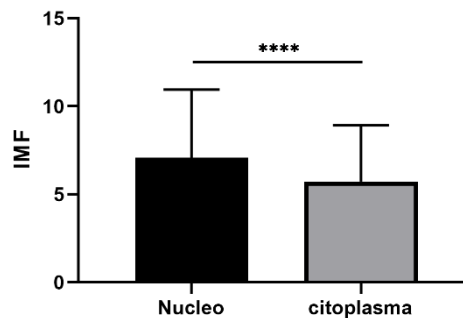
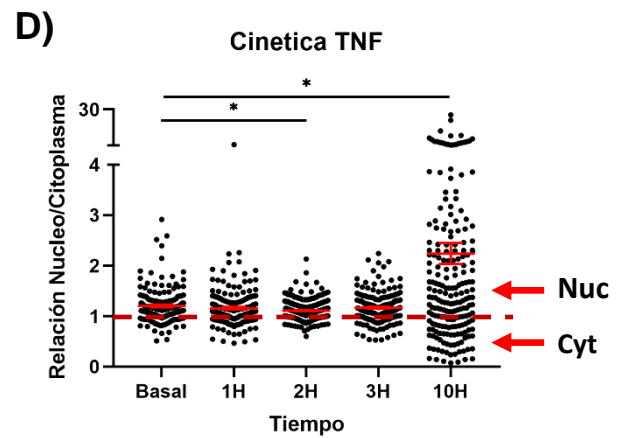
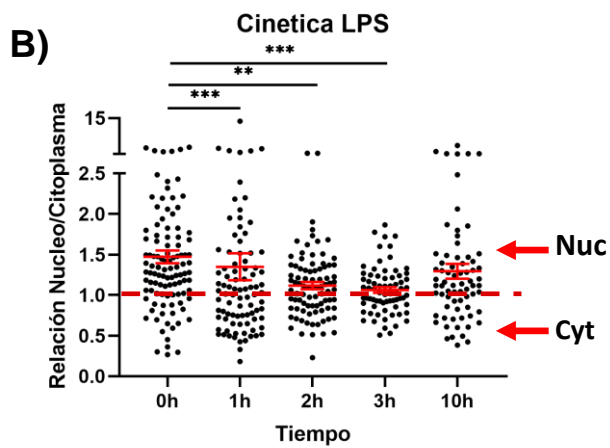
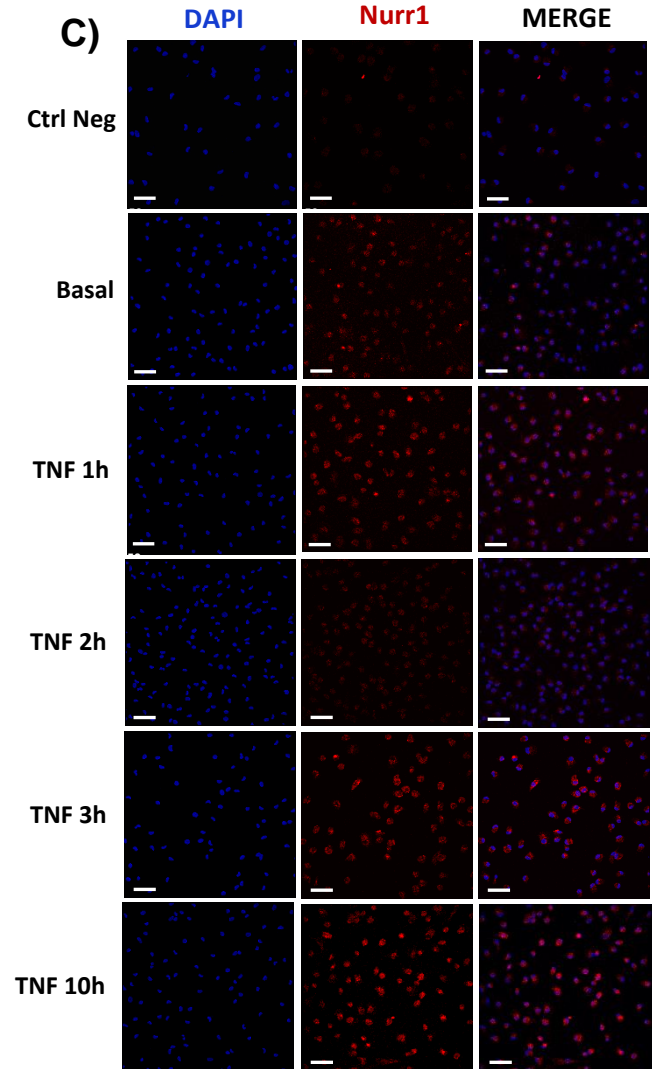
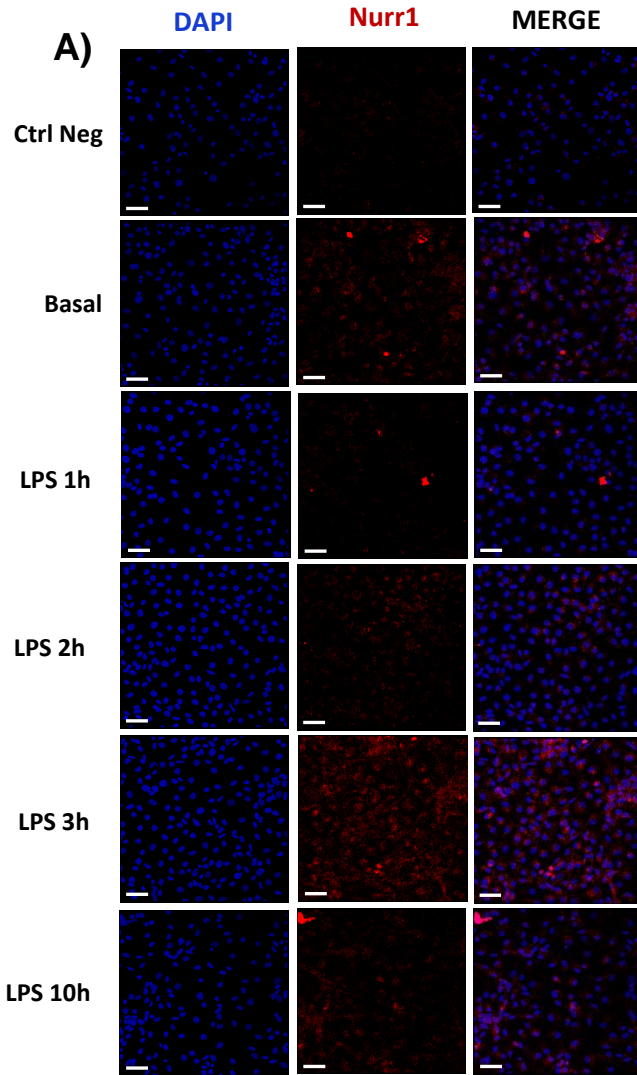


Figura 17. Distribución subcelular de Nurr1 en condiciones basales. Cuantificación de la IMF de Nurr1 en el compartimento nuclear y citoplásmico en los M ϕ s diferenciados *in vitro* con GM-CSF. La evaluación se realizó en distintos campos obtenidos mediante microscopía Confocal tras la tinción de los M ϕ s con un anticuerpo anti-Nurr1. Se muestra la media \pm SD de la IMF. Estadística: test *t* de Student de dos colas pareado, **** p :<0.0001.

En los M ϕ s estimulados con LPS Nurr1 aumentó su presencia a nivel citosólico, evidenciado por una disminución significativa en la relación núcleo/citoplasma del receptor comparado con la condición basal (**Fig. 18A, B**). Este efecto se observó desde la primera hora tras el estímulo, y continuó aumentando hasta llegar a un

nivel máximo registrado a las 3 h. Después de 10 h de estimulación con LPS la relación núcleo/citoplasma de Nurr1 regresó a niveles basales (**Fig. 18A, B**). En cambio, la activación de los Mφs con TNF provocó el efecto contrario, y Nurr1 incrementó su presencia en el núcleo de forma tardía (10 h), mientras que a tiempos más tempranos no se detectó un cambio sustancial en la localización de este receptor con respecto a los niveles basales (**Fig. 18C, D**). Este mismo efecto se presentó en los Mφs estimulados con IL-4 (**Fig. 18E, F**). La activación de los Mφs con IL-10 no mostró cambios importantes en la localización subcelular de Nurr1 (**Fig. 18G, H**). De manera notable, IL-10 fue el único estímulo que indujo un cambio sostenible en la expresión de Nurr1, incrementando sus niveles tras 2 h de exposición y manteniendo este incremento hasta el último tiempo evaluado (**Fig. 19**). Tras 3 h de estimulación con IL-4 se detectó un decremento en la expresión de Nurr1, pero éste fue transitorio. Sin embargo, tanto los resultados obtenidos con IL-4 como con IL-10 son preliminares ya que sólo se pudieron analizar los Mφs procedentes de un donante.

En conjunto, estos resultados sugieren que la alteración de la localización subcelular de Nurr1 en los Mφs M1 diferenciados *in vitro* se da preferentemente en respuesta a estímulos inflamatorios y esta respuesta puede ser dada por un aumento de Nurr1 en el compartimento nuclear o citosólico dependiendo del estímulo aplicado.



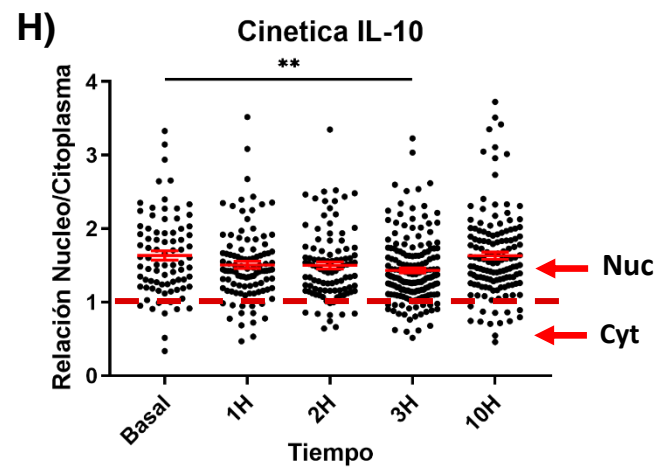
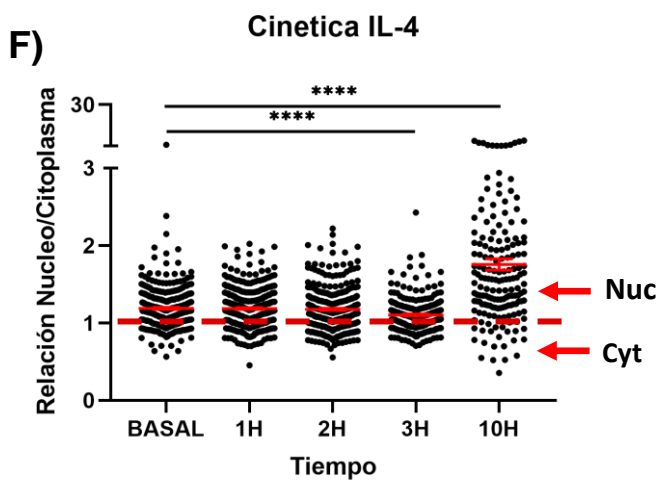
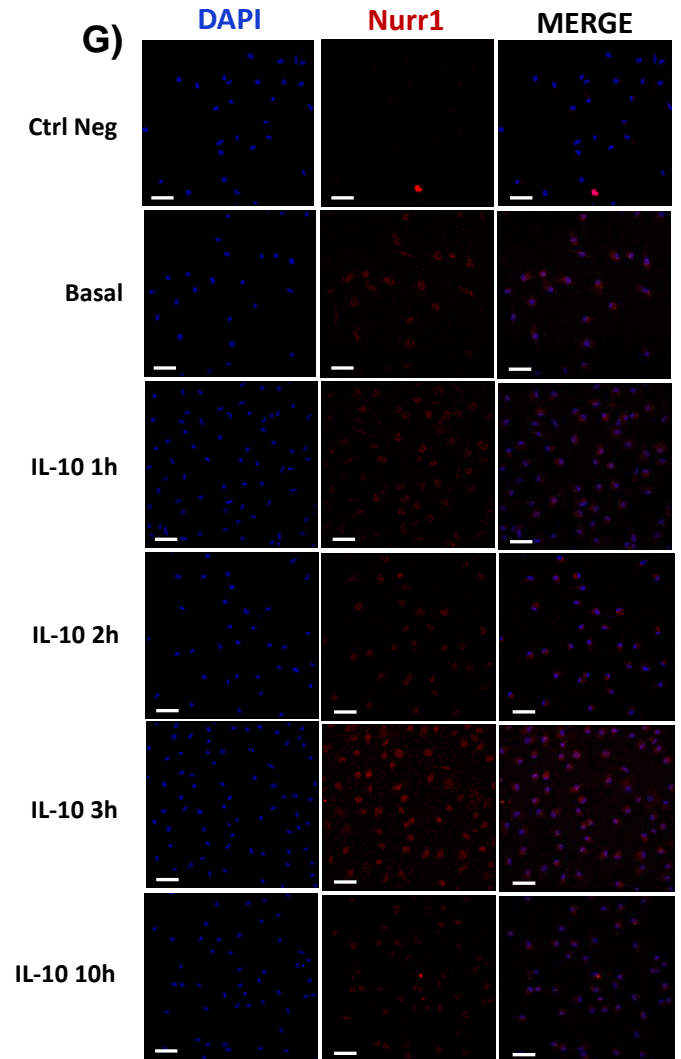
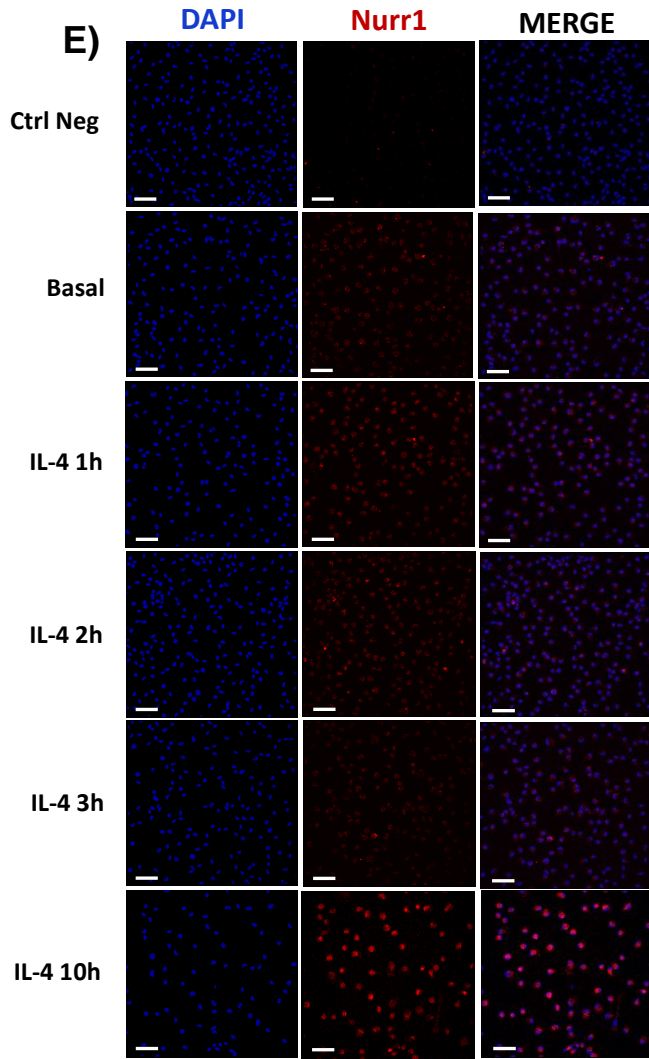


Figura 18. La distribución subcelular de Nurr1 es alterada por estímulos inflamatorios. Los Mφs fueron analizados en condiciones basales (Basal, 0 h) y tras su estimulación con LPS (A, B), TNF (C, D), IL-4 (E, F), o IL-10 (G, H), durante 1-10 h. (A, C, E, G). Imágenes de microscopía Confocal de los Mφs estimulados con LPS (A), TNF (C), IL-4 (E), o IL-10 (G), teñidos con un anticuerpo anti-Nurr1 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se muestran las tinciones simples y las tinciones dobles (merge). Ctrl neg: Mφs no estimulados teñidos con un anticuerpo primario control de isotipo. Barra, 50 μm. (B, D, F, H). Cuantificación de la localización subcelular de Nurr1 en los tiempos indicados tras el estímulo con LPS (B), TNF (D), IL-4 (F), o IL-10 (H). Cada punto representa la relación entre la IMF de Nurr1 en el núcleo y su IMF en el citoplasma en cada célula cuantificada. Las células con una expresión preferencial de Nurr1 en el núcleo (Nuc) presentan una relación >1, mientras que las células con expresión preferencial de Nurr1 en el citoplasma (Cyt) presentan una relación <1. Las cuantificaciones se realizaron en un donante para IL-4 e IL-10, 3 donantes para LPS y 4 donantes para TNF. Barras rojas: media ± SEM. Estadística (LPS, TNF, IL-4 o IL-10 vs basal): * p:<0.05, ** p:<0.005, *** p:<0.0005, **** p:<0.000

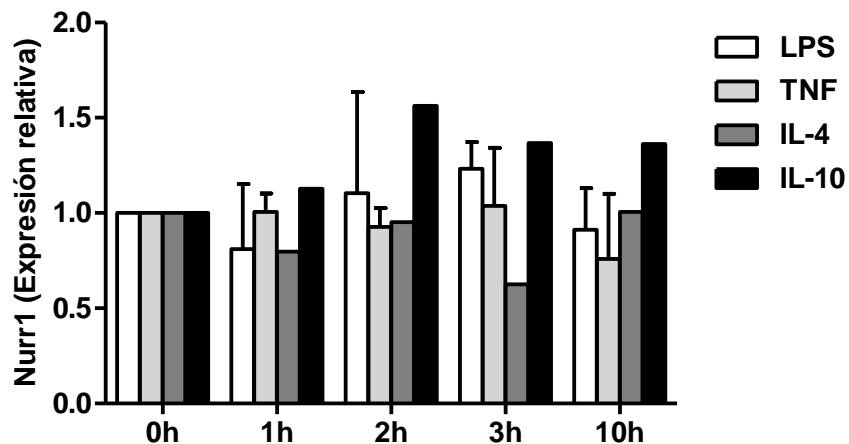


Figura 19. IL-10 incrementa la expresión de Nurr1. Los Mφs fueron analizados en condiciones basales (0 h) y tras su estimulación con LPS (barras blancas), TNF (barras gris claro), IL-4 (barras gris oscuro) o IL-10 (barras negras) en los tiempos indicados. La expresión de Nurr1 se evaluó mediante inmunofluorescencia como se indica en la Fig. 18, y se expresa relativa a los niveles basales. Se muestran datos obtenidos de la expresión de Nurr1 en el total de la superficie celular. Las cuantificaciones se realizaron en un donante para IL-4 e IL-10, 3 donantes para LPS y 4 donantes para TNF. El análisis estadístico para LPS y TNF no mostró diferencias significativas.

La activación de Nurr1 con un agonista provoca un incremento en su localización nuclear

Se ha descrito que la unión de algunos receptores nucleares con compuestos agonistas induce su translocación al compartimento nuclear por exposición de sus secuencias de localización nuclear⁷¹. Por esta razón se decidió evaluar si el uso de un agonista de Nurr1 podría tener un efecto similar. Los Mφs M1 generados *in vitro* se trataron con el agonista de Nurr1 CDIM12 a dos concentraciones diferentes (1 μM y 10 μM) durante 1, 2, 4 y 8 h y se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Se analizó de forma cuantitativa la intensidad media de fluorescencia de Nurr1 en las imágenes de microscopia Confocal en el núcleo y en el citoplasma de los Mφs (**Fig. 20**).

En los Mφs tratados con CDIM12 se observó un incremento significativo de la presencia de Nurr1 en el compartimento nuclear desde la primera hora de estimulación con el agonista, denotado por un incremento en la relación núcleo/citoplasma con respecto a la condición basal. Este incremento se observó hasta las 4 h de exposición, en donde se alcanzó el nivel más alto registrado de la relación núcleo/citoplasma. A tiempos tardíos de estímulo (8 h), los niveles de Nurr1 en el núcleo con relación al citoplasma regresaron a niveles basales. Este comportamiento se observó con las dos concentraciones de CDIM12 administradas a los Mφs. Además, detectamos que CDIM12 induce un notable incremento en la expresión de Nurr1, evaluado por inmunofluorescencia (**Fig. 21A**) y por Western blot (**Fig. 21B**).

Estos resultados nos sugieren que el cambio de localización de Nurr1 obtenido con los estímulos inflamatorios podría ser debido a una activación de este receptor nuclear. El incremento en la expresión de Nurr1 mediado por CDIM12 podría ser consecuencia de una auto-regulación positiva de este factor de transcripción sobre su propio gen.

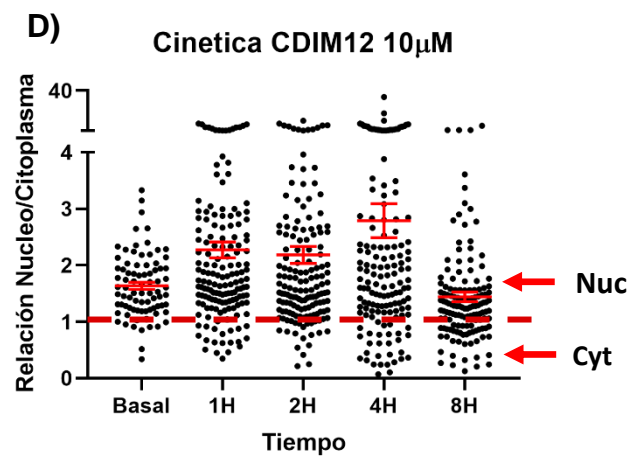
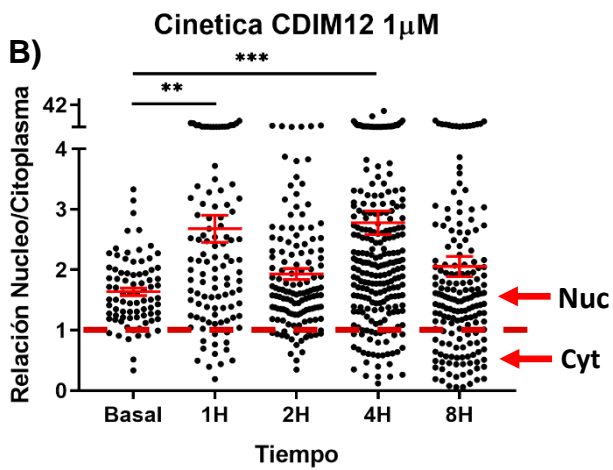
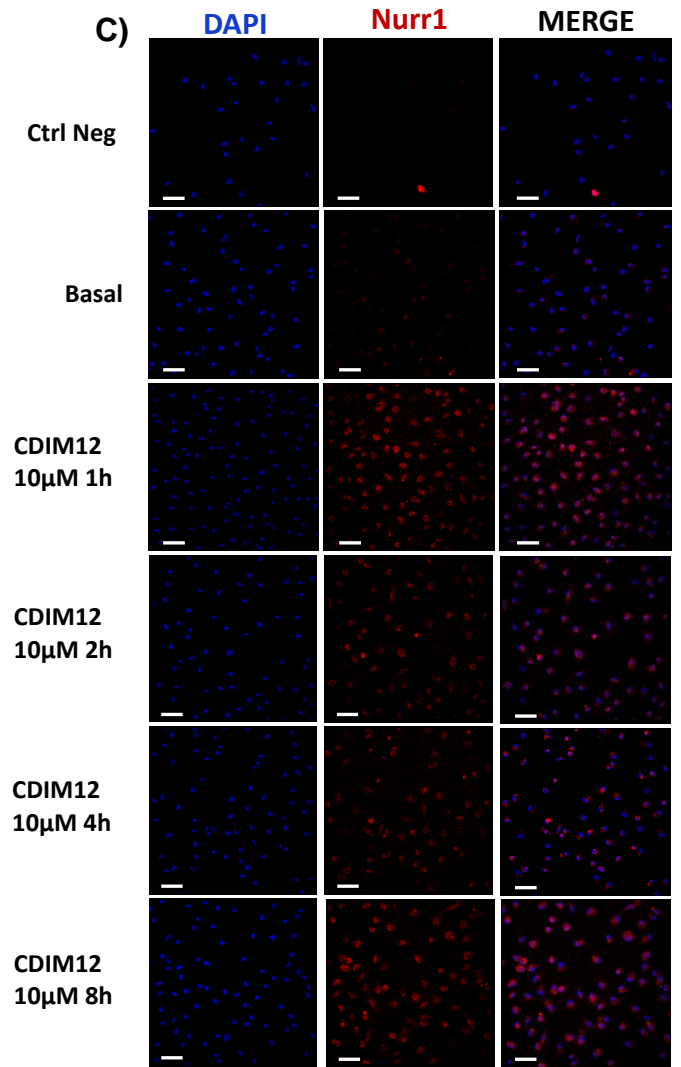
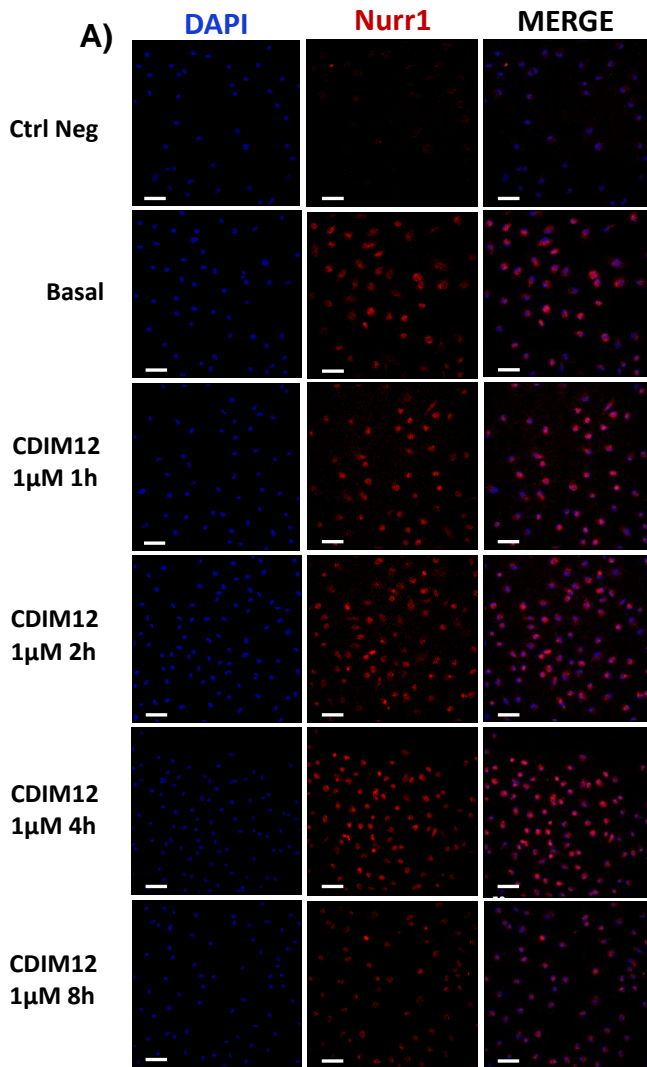


Figura 20. El estímulo con CDIM12 provoca un aumento de Nurr1 en el compartimento nuclear. Los Mφs fueron analizados en condiciones basales (Basal, 0 h) y tras su estimulación con CDIM12 1 μM (**A, B**) o CDIM12 10 μM (**C, D**). (**A, C**). Imágenes de microscopía Confocal de los Mφs en condiciones basales y tras 1, 2, 4 y 8 h de estimulación con CDIM12 1 μM (**A**) y 10 μM (**C**) teñidos con un anticuerpo anti-Nurr1 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se muestran las tinciones simples y las tinciones dobles (merge). Ctrl neg: Mφs no estimulados teñidos con un anticuerpo primario control de isotipo. Barra, 50 μm. (**B, D**). Cuantificación de la localización subcelular de Nurr1 en los tiempos indicados tras el estímulo con CDIM12 1 μM (**B**) o CDIM12 10 μM (**D**). Cada punto representa la relación entre la IMF de Nurr1 en el núcleo y su IMF en el citoplasma en cada célula cuantificada. Las células con una expresión preferencial de Nurr1 en el núcleo (Nuc) presentan una relación >1, mientras que las células con expresión preferencial de Nurr1 en el citoplasma (Cyt) presentan una relación <1. Barras rojas: media ± SEM. Estadística (CDIM12 vs basal): ** p:<0.005, *** p:<0.0005.

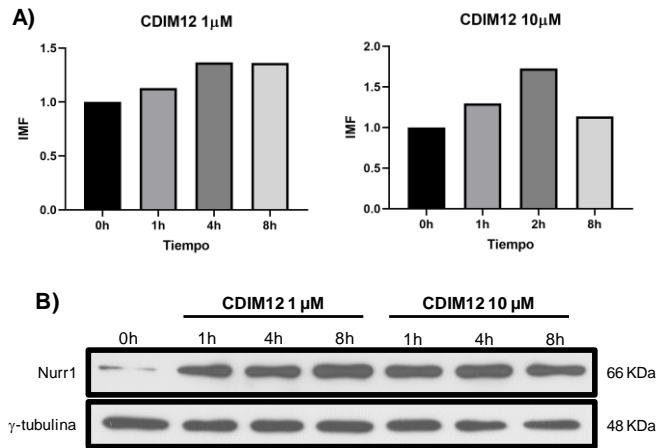


Figura 21. El estímulo con CDIM12 provoca un aumento global en la expresión de Nurr1. Los Mφs fueron analizados en condiciones basales (0 h) y tras su estimulación con CDIM12 (1 y 10 μM) en los tiempos indicados. (**A**) Expresión de Nurr1 en respuesta a 1 μM CDIM12 (panel izquierdo) o 10 μM CDIM12 (panel derecho), evaluada mediante inmunofluorescencia como se indica en la **Fig. 20**. Los resultados en presencia de CDIM12 se expresan relativos a los niveles basales. Se muestran datos obtenidos de la expresión de Nurr1 en el total de la superficie celular. Las cuantificaciones se realizaron en un donante para cada concentración del agonista. (**B**) Expresión de Nurr1 en respuesta a CDIM12 1 y 10 μM evaluada mediante Western blot. La expresión de γ-tubulina se incluyó como control de carga. Se muestran los datos de un donante evaluado.

La estaurosporina inhibe la alteración en la localización subcelular de Nurr1 inducida por estímulos inflamatorios

Para determinar si la alteración en la localización subcelular de Nurr1 producida en respuesta a estímulos inflamatorios era debida a alguna cinasa activada por estos estímulos, los M ϕ s se pre-trataron con el inhibidor de proteínas cinasas estaurosporina. Los M ϕ s se trataron con este inhibidor 1 h antes del estímulo con LPS o TNF, y se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta los M ϕ s de forma basal y tras ser incubados con cada uno de los estímulos mencionados durante 1, 2, 3 y 10 h (**Fig. 22**). Se analizó de forma cuantitativa la intensidad relativa de fluorescencia de Nurr1 en las imágenes de microscopia Confocal en el núcleo y en el citoplasma de los M ϕ s.

En los M ϕ s estimulados con LPS la presencia de Nurr1 en el citoplasma se incrementó desde la primera hora tras el estímulo, esto demostrado por una disminución significativa en la relación núcleo/citoplasma comparado con el nivel basal, alcanzando el nivel más bajo a las 3 h (**Fig. 22A, B**). Por otro lado, en los M ϕ s pre-tratados con estaurosporina el efecto del LPS sobre la localización de Nurr1 no fue significativo en ninguno de los tiempos evaluados con respecto a la condición basal (**Fig. 22A, C**). Cuando comparamos ambas cinéticas observamos que existe una diferencia significativa en cada uno de los tiempos evaluados (**Fig. 22D**), demostrando que la estaurosporina inhibió de manera efectiva el efecto producido tras el estímulo con LPS.

El estímulo con TNF en los M ϕ s provocó, como ya se había visto, un incremento de Nurr1 en el compartimento nuclear solamente tras 10 h de estímulo (**Fig. 22E, F**). Sin embargo, en los M ϕ s que pre-tratados con estaurosporina no se detectaron cambios significativos con respecto a la condición basal en ninguno de los tiempos evaluados (**Fig. 22E, G**). La comparación de ambas cinéticas muestra que existe una diferencia significativa a las 10 h entre la cinética con TNF y la cinética con TNF + inhibidor, demostrando que estaurosporina reduce la acumulación nuclear de Nurr1 inducida por TNF (**Fig. 22H**).

Los resultados nos sugieren que alguna(s) cinasa(s) implicada en la vía de señalización de LPS o TNF está provocando un cambio en la localización de Nurr1 en los M ϕ s activados con estos estímulos.

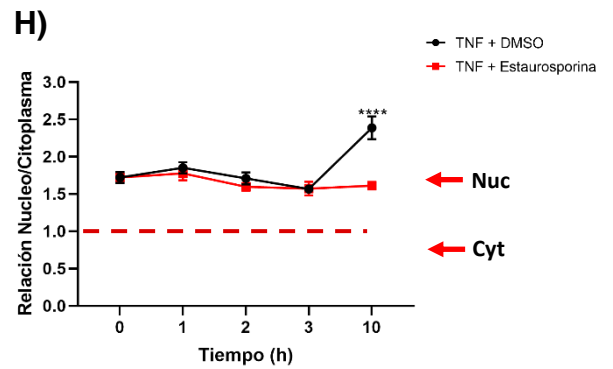
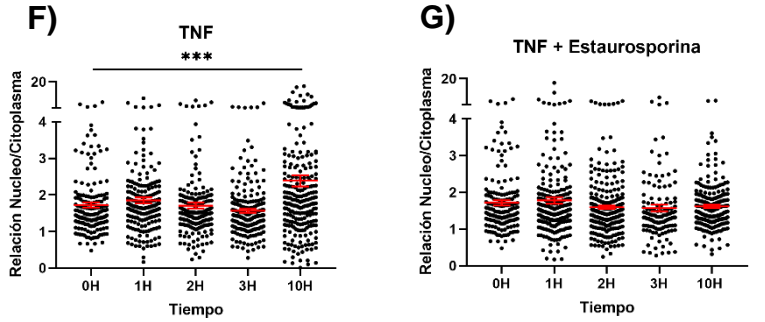
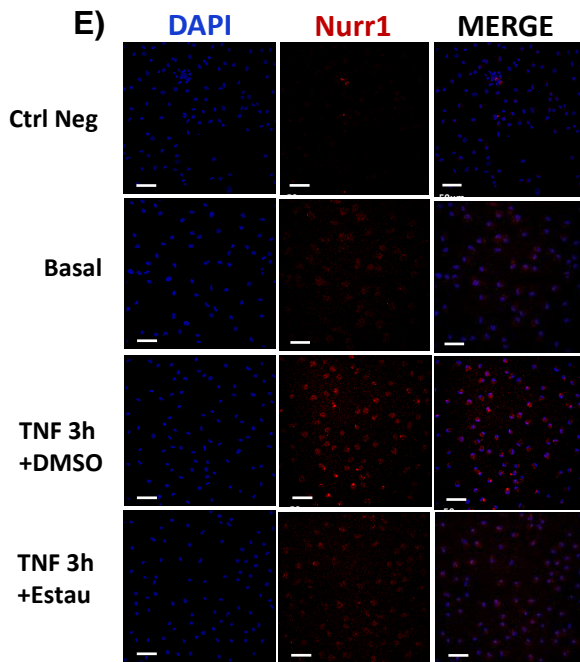
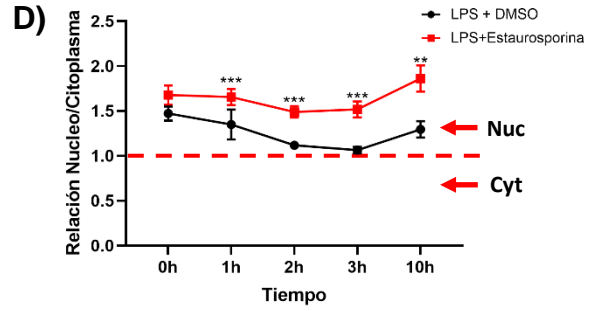
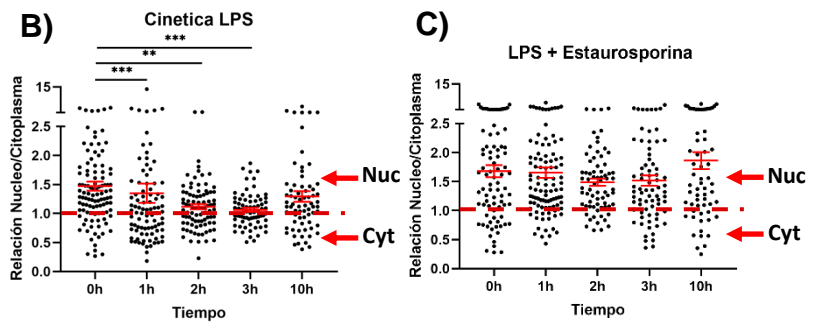
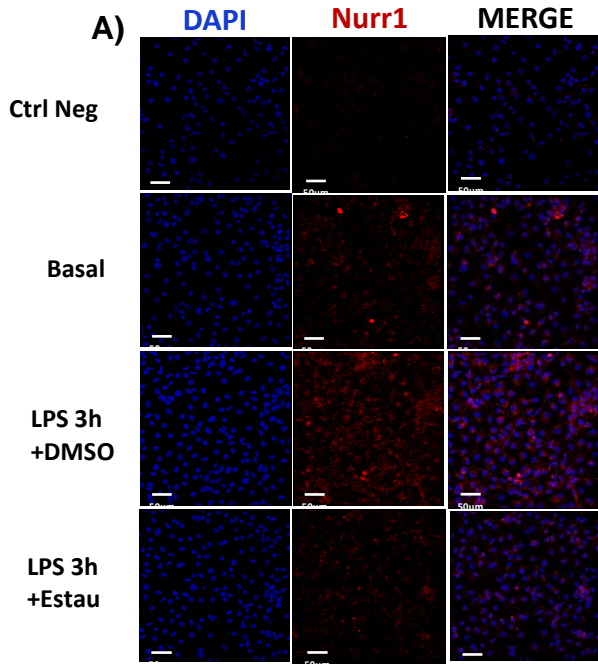


Figura 22. La estaurosporina inhibe la alteración de la localización subcelular de Nurr1 en respuesta a estímulos inflamatorios. Los Mφs fueron analizados en condiciones basales (Basal, 0 h) y tras su estimulación con LPS (**A-D**) o TNF (**E-H**), en ausencia (DMSO) o presencia de estaurosporina (10 nM) durante 1-10 h. (**A, E**). Imágenes de microscopía Confocal de los Mφs estimulados con LPS (**A**) o TNF (**E**) teñidos con un anticuerpo anti-Nurr1 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se muestran las tinciones simples y las tinciones dobles (merge). Ctrl neg: Mφs no estimulados teñidos con un anticuerpo primario control de isotipo. Barra, 50 μm. (**B, C, F, G**). Cuantificación de la localización subcelular de Nurr1 en los tiempos indicados tras el estímulo con LPS (**B, C**) o TNF (**F, G**). Cada punto representa la relación entre la IMF de Nurr1 en el núcleo y su IMF en el citoplasma en cada célula cuantificada. Las células con una expresión preferencial de Nurr1 en el núcleo (Nuc) presentan una relación >1, mientras que las células con expresión preferencial de Nurr1 en el citoplasma (Cyt) presentan una relación <1. Barras rojas: media ± SEM. (**D, H**). Expresión de Nurr1 (relación núcleo/citoplasma) en Mφs estimulados con LPS (**D**) o TNF (**H**) en ausencia (DMSO) o presencia de estaurosporina en los tiempos indicados. Estadística (LPS o TNF vs basal): ** p:<0.005, *** p:<0.0005, **** p:<0.0001.

8 DISCUSION

La inflamación es una respuesta natural adaptativa que puede ser detonada por distintos estímulos nocivos, como infecciones o lesiones de un tejido^{1,2}. Una respuesta inflamatoria controlada es benéfica ya que provee protección contra la infección o lesión, pero se puede convertir en un proceso dañino cuando existe una desregulación. Existen una gran cantidad de células inmunes involucradas en un proceso inflamatorio, pero una de las más importantes son los Mφs, ya que están presentes en todas las fases de la inflamación. Los Mφs son mediadores cruciales en las respuestas inflamatorias y los receptores tipo toll (TLRs) son los inductores mejor caracterizados de la inflamación. La respuesta a estos estímulos induce (o reprime) la expresión de miles de genes en los Mφs que conlleva a una activación de los macrófagos^{21,22}. Estos conjuntos de genes son regulados por factores de transcripción²³.

Para conocer cuáles de estos factores de transcripción eran importantes en los Mφs se realizó un ensayo de microarreglos de expresión en donde se encontró que existía una expresión diferencial de genes al comparar los Mφs generados *in vitro* con GM-CSF (proinflamatorios) con los de M-CSF (anti-inflamatorios). Uno de los genes diferencialmente expresados fue el gen de NR4A2 que codifica para el receptor nuclear huérfano Nurr1. Se ha reportado que la expresión anormal de Nurr1 esta correlacionada con distintos desordenes inflamatorios⁵⁷. Debido a que Nurr1 pertenece a la familia de receptores nucleares huérfanos, la actividad de estos factores de transcripción está estrechamente controlada a nivel de expresión, localización subcelular y modificaciones postraduccionales⁵³. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos de regulación de Nurr1 en los Mφs.

Primeramente, decidimos analizar el efecto de distintas citocinas sobre la localización de Nurr1 en Mφs generados *in vitro* realizando una cinética de estimulación con citocinas pro-inflamatorias de tipo 1 (TNF y LPS), de tipo 2 (IL-4) y anti-inflamatorias (IL-10). Encontramos que las citocinas inflamatorias eran las que tenían un efecto más notorio sobre la localización de Nurr1, en donde el TNF y la IL-4 provocaban un incremento tardío en la localización nuclear de Nurr1. El efecto de

TNF sobre Nurr1 en los M ϕ s corresponde con el efecto producido en otros tipos celulares tales como sinoviocitos y fibroblastos sinoviales en donde el estímulo con TNF provoca que Nurr1 se relocalice en el núcleo^{53,70}. Por otro lado, no se ha reportado el efecto que la IL-4 pudiera tener en Nurr1 tanto en su expresión como en su localización. Sin embargo, se ha descrito que Nurr1 podría estar participando directamente en la transcripción de arginasa-1⁷², misma que se induce tras el estímulo con IL-4. Esto sugiere que la IL-4 puede estar reclutando a Nurr1 en el núcleo para inducir la transcripción de arginasa-1.

Se ha descrito que en células de microglía y neuronas dopaminérgicas de ratón la estimulación con LPS provoca un aumento de Nurr1 en el compartimiento nuclear^{59,60,73}. Por otra parte, los resultados nos mostraron que el LPS provocó el efecto opuesto sobre Nurr1. En los M ϕ s estimulados con LPS hubo un incremento de Nurr1 a nivel citosólico con respecto a la condición basal desde la primera hora tras el estímulo. Aun no se ha reportado que el LPS tenga este mismo efecto sobre Nurr1, sin embargo, este comportamiento no es ajeno a Nurr1 debido a que ya se ha descrito que tras someter a las líneas celulares HEK298 y HeLa a estrés oxidativo Nurr1 tiende incrementar su presencia en citoplasma^{67,69}.

Los resultados nos muestran que en los M ϕ s diferenciados *in vitro* también existen estímulos capaces de alterar la localización de Nurr1. Esto nos llevó a preguntarnos qué podría estar regulando que Nurr1 altere su localización, tras estimular a los M ϕ s con las citocinas pro-inflamatorias. Es bien conocido que la importación y exportación nuclear es un fenómeno dependiente de exportinas e importinas. Sin embargo, se sabe que en algunos casos son necesarias las modificaciones postraduccionales para que exportinas o importinas puedan reconocer a su proteína blanco³³. Se ha descrito que Nurr1 puede ser blanco de diferentes cinasas que pueden afectar su actividad y su localización^{61,62,64}. Por esta razón decidimos probar si alguna cinasa pudiese estar involucrada en la alteración de la localización de Nurr1. Para eso los M ϕ s generados *in vitro* se pre-trataron con estaurosporina, que es un inhibidor competitivo de ATP de amplio espectro, y se retaron con TNF y LPS. La estaurosporina inhibió el efecto producido por ambos estímulos sobre Nurr1. Esto sugiere una posible implicación de una vía de señalización sobre la localización de

Nurr1, debido a que ya se ha descrito en otros sistemas celulares que las MAPK juegan un papel muy importante en la alteración de la localización de Nurr1^{64,68,69}.

Sabemos que Nurr1 pertenece a la familia de receptores nucleares huérfanos debido a que no se ha encontrado un agonista endógeno, sin embargo, se ha descrito el uso de C-DIMs (paraphenyl substituted diindolylmethane) como activadores transcripcionales de esta familia de receptores (NR4A)^{74,75}. CDIM12 ha sido de los agonistas más usados debido a que es un potente activador transcripcional y además, recientemente se ha asociado a una actividad anti-inflamatoria debido al papel que se le ha dado a Nurr1 en la regulación de la respuesta inflamatoria en células de microglía de ratón o en fibroblastos sinoviales. Por otro lado, también se ha descrito que CDIM12 también es capaz de provocar una alteración en la localización de Nurr1, induciendo un incremento de su expresión a nivel nuclear^{60,70}. Esto corresponde con los resultados mostrados en este trabajo, en donde se observa que en los Mφs estimulados con CDIM12, hay un incremento de Nurr1 en el compartimento nuclear. Esto nos sugiere que posiblemente el cambio de localización de Nurr1 y su activación estén relacionados.

9 CONCLUSIONES

- Los estímulos inflamatorios son capaces de alterar la localización subcelular de Nurr1.
- La alteración en la localización de Nurr1 difiere según el estímulo utilizado, por lo que Nurr1 podría tener distintos roles en un proceso inflamatorio.
- La inhibición de proteínas cinasas previene la relocalización de Nurr1 inducida por LPS o TNF, lo que sugiere que la fosforilación es un mecanismo importante en la regulación de la localización subcelular de Nurr1.
- La activación de Nurr1 con el agonista CDIM12 en ausencia de estímulos inflamatorios promueve un incremento de su concentración nuclear, así como un incremento en su expresión. Estos datos sugieren que CDIM12 podría provocar un cambio conformacional de la molécula que conlleve la exposición de sus NLSs, además de un aumento en su actividad transcripcional.

10 PERSPECTIVAS

- 1.- Identificar las cinasas involucradas en la localización diferencial de Nurr1 mediante el uso de inhibidores específicos.
- 2.- Evaluar si los cambios en la localización subcelular de Nurr1 afectan la localización de factores de transcripción importantes en los procesos inflamatorios y que pueden formar complejos con este receptor, como NF- κ B p65.

11 REFERENCIAS

1. Majno G, Joris I. *Cells, Tissues and Disease* (Oxford Univ. Press, 2004).
2. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Robbins Basic Pathology* (Saunders, 2003).
3. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.* **118**, 413–420 (2008).
4. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182 (2006).
5. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
6. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
7. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology* **154**, 186-195 (2018).
8. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**: 21–35 (2014).
9. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* **5**: 1–22 (2014).
10. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
11. Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, Chandrasekaran P, Mosser DM. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation. *Ann. Rev. Physiol.* **79**, 567-592 (2017).
12. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527–2534 (1989).
13. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells *in vivo*. *Immunity* **11**, 753–761 (1999).

14. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* **37**, S9–S17 (2007).
15. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.* **13**, 851–856 (2007).
16. Mackaness GB. Cellular immunity and the parasite. *Adv. Exp. Med. Biol.* **93**, 65–73 (1977).
17. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
18. Martinez F, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Reports*, **6**, 13 (2014).
19. Sica A, Mantovani A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
20. Gonzalez-Dominguez E, Samaniego R, Flores-Sevilla J, Campos-Campos S, Gomez-Campos G, Salas A, *et al.* CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 453–466. (2015).
21. Ramsey SA, Klemm SL, Zak DE, Kennedy KA, Thorsson V, Li B, *et al.* Uncovering a macrophage transcriptional program by integrating evidence from motif scanning and expression dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000021 (2008).
22. Ravasi T, Wells CA, Hume DA. Systems biology of transcription control in macrophages. *Bioassays* **29**, 1215–1226 (2007).
23. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 692 (2009).
24. Litvak V, Ramsey SA, Rust AG, Zak DA, Kennedy KA, Lampano AE, *et al.* Function of C/EBP δ in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nat. Immunol.* **10**, 437–443 (2009).
25. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* **26**, 6816–6828 (2007).
26. Valledor AF, Borrás FE, Cullell-Young M, Celada A. Transcription factors that

- regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 405–417 (1998).
27. Glass CK, Natoli G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat. immunol.* **17**, 26 (2016).
 28. McKenna NJ, Cooney AJ, DeMayo FJ, Downes M, Glass CK, Lanz RB, *et al.* (2009). Minireview: evolution of NURSA, the nuclear receptor signaling atlas. *Mol. Endocrinol.* **23**, 740–746.
 29. Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, *et al.* A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol. Endocrinol.* **19**, 2466–2477 (2005).
 30. Robinson-Rechavi M, Garcia HE, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.* **116**, 585–586 (2003).
 31. Lee JS, Kim KI, Baek SH. Nuclear receptors and coregulators in inflammation and cancer. *Cancer Lett.* **267**, 189–196 (2008).
 32. Skerrett R, Malm T, Landreth G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* **72**, 104–116 (2014).
 33. Ortega-Domínguez B, Herrera-Ramírez M, Tecalco-Cruz, AC. Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* **18** 131–143 (2015).
 34. Sala S, Ampe C. An emerging link between LIM domain proteins and nuclear receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1959–1971 (2018).
 35. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 486–504 (2012).
 36. Wager CML, Arnett E, Schlesinger LS. Macrophage nuclear receptors: Emerging key players in infectious diseases. *PLoS Pathogens* **15**, e1007585 (2019).
 37. Hazel TG, Nathans D, Lau LF. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 8444–8448 (1988).
 38. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol. Endocrinol.* **6**, 2129–2135 (1992).

39. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim. Biophys. Acta* **1308**, 205–214 (1996).
40. Milbrandt J. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* **1**, 183–188 (1988).
41. Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e002 (2006).
42. Wilson TE, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 9186–9190 (1993).
43. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, *et al.* Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5946–5951 (1997).
44. Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* **9**, 769–782 (1995).
45. Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, *et al.* Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 4013–4018 (1998).
46. Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, *et al.* Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* **29**, 15923–15932 (2009).
47. Amoasii L, Sanchez-Ortiz E, Fujikawa T, Elmquist JK, Bassel-Duby R, Olson EN. NURR1 activation in skeletal muscle controls systemic energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **116**, 11299–11308 (2019).
48. Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, Morita R, Hori S, Waldmann H, *et al.* The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat. Commun.* **2**, 269 (2011).
49. Li QX, Ke N, Sundaram R, Wong-Staal, F. NR4A1, 2, 3 – an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* **21**, 533–540 (2006).

50. Pirih FQ, Tang A, Ozkurt IC, Nervina JM, Tetradis S. Nuclear orphan receptor Nurr1 directly transactivates the osteocalcin gene in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **279**, 53167–53174 (2004).
51. Pei L, Castrillo A, Chen M, Hoffmann A, Tontonoz P. Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J. Biol. Chem.* **280**, 29256–29262 (2005).
52. Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, *et al.* Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555 (2003).
53. Aherne CM, McMorrow J, Kane D, FitzGerald O, Mix KS, Murphy EP. Identification of NR4A2 as a transcriptional activator of IL-8 expression in human inflammatory arthritis. *Mol. Immunol.* **46**, 3345–3357 (2009).
54. Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 8381–8386 (2008).
55. O'Kane M, Markham T, McEvoy AN, Fearon U, Veale DJ, FitzGerald O, *et al.* Increased expression of the orphan nuclear receptor NURR1 in psoriasis and modulation following TNF- α inhibition. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 300–310 (2008).
56. Han YF, Cao GW. Role of nuclear receptor NR4A2 in gastrointestinal inflammation and cancers. *World J. Gastroenterol.* **18**, 6865 (2012).
57. Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat. Genetics* **33**, 85 (2002).
58. Saijo K, Winner B, Carson C, Collier J, Boyer L, Rosenfeld M, *et al.* A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* **137**, 47–59 (2009).
59. Shao QH, Yan WF, Zhang Z, Ma KL, Peng SY, Cao YL, *et al.* Nurr1: A vital participant in the TLR4-NF- κ B signal pathway stimulated by α -synuclein in BV-2 cells. *Neuropharmacol.* **144**, 388–399 (2019).
60. De Miranda BR, Popichak KA, Hammond SL, Jorgensen BA, Phillips AT, Safe S, *et al.* The Nurr1 activator 1, 1-bis (3'-indolyl)-1-(p-chlorophenyl) methane

blocks inflammatory gene expression in BV-2 microglial cells by inhibiting nuclear factor κ B. *Mol. Pharmacol.* **87**, 1021–1034 (2015).

61. Galleguillos D, Vecchiola A, Fuentealba JA, Ojeda V, Alvarez K, Gómez A, *et al.* PIASy represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1. *J. Biol. Chem.* **279**, 2005–2011 (2004).

62. Arredondo C, Orellana M, Vecchiola A, Pereira LA, Galdames L, Andrés ME. PIASy enhanced SUMO-2 modification of Nurr1 activation-function-1 domain limits Nurr1 transcriptional synergy. *PLoS One* **8** (2013).

63. Zhang T, Jia N, Fei E, Wang P, Liao Z, Ding L, *et al.* Nurr1 is phosphorylated by ERK2 in vitro and its phosphorylation upregulates tyrosine hydroxylase expression in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* **423**, 118–122 (2007).

64. Sekine Y, Takagahara S, Hatanaka R, Watanabe T, Oguchi H, Noguchi T, *et al.* p38 MAPKs regulate the expression of genes in the dopamine synthesis pathway through phosphorylation of NR4A nuclear receptors. *J. Cell. Sci.* **124**, 3006–3016 (2011)..

65. Jagirdar K, Yin K, Harrison M, Lim W, Muscat GE, Sturm RA, *et al.* The NR4A2 nuclear receptor is recruited to novel nuclear foci in response to UV irradiation and participates in nucleotide excision repair. *PLoS One* **8** (2013).

66. Malewicz M, Kadkhodaei B, Kee N, Volakakis N, Hellman U, Viktorsson K, *et al.* Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* **25**, 2031–2040 (2011).

67. Watanabe T, Sekine S, Naguro I, Sekine Y, Ichijo H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway-dependent cytoplasmic translocation of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for oxidative stress-induced necrosis. *J. Biol. Chem.* **290**, 10791–10803 (2015).

68. Jo AY, Kim MY, Lee HS, Rhee YH, Lee JE, Baek KH, *et al.* Generation of dopamine neurons with improved cell survival and phenotype maintenance using a degradation-resistant nurr1 mutant. *Stem Cells* **27**, 2238–2246 (2009).

69. García-Yagüe ÁJ, Rada P, Rojo AI, Lastres-Becker I, Cuadrado A. Nuclear import and export signals control the subcellular localization of Nurr1 protein in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **288**, 5506–5517 (2013).

70. Afzali MF, Popichak KA, Burton LH, Klochak AL, Wilson WJ, Safe S, *et al.* A novel diindolylmethane analog, 1, 1-bis (3'-indolyl)-1-(p-chlorophenyl) methane, inhibits the tumor necrosis factor-induced inflammatory response in primary murine synovial fibroblasts through a Nurr1-dependent mechanism. *Mol. Immunol.* **101**, 46–54 (2018).
71. Song Z, Pollenz RS. Functional analysis of murine aryl hydrocarbon (AH) receptors defective in nuclear import: Impact on AH receptor degradation and gene regulation. *Mol. Pharmacol.* **63**, 597–606 (2003).
72. Fan X, Luo G, Ming M, Pu P, Li L, Yang D, *et al.* Nurr1 expression and its modulation in microglia. *Neuroimmunomodulation* **16**, 162–170 (2009).
73. Mahajan S, Saini A, Chandra V, Nanduri R, Kalra R, Bhagyaraj E, *et al.* Nuclear receptor Nr4a2 promotes alternative polarization of macrophages and confers protection in sepsis. *J. Biol. Chem.* **290**, 18304–18314 (2015).
74. Dubois C, Hengerer B, Mattes H. Identification of a potent agonist of the orphan nuclear receptor Nurr1. *Chem. Med. Chem.* **1**, 955–958 (2006).
75. Li X, Lee SO, Safe S. Structure-dependent activation of NR4A2 (Nurr1) by 1, 1-bis (3'-indolyl)-1-(aromatic) methane analogs in pancreatic cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1445–1455 (2012).