

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química Biológica

"Estudio de las proteínas FKBPs de alto peso molecular como moduladoras de la acción biológica de NF- κB"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad

de Buenos Aires, Área Química Biológica

Autora: Lic. Sonia Alejandra De Leo

Director: Dr. Mario D. Galigniana

Directora asistente: Dra. Alejandra G. Erlejman

Consejera de estudios: Dra. Adali Pecci

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA e Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), CONICET.

Fecha de defensa: 6 de diciembre de 2018

Buenos Aires, 2018

A mi mamá y a mi papá,

A Nacho

<u>Resumen</u>

Se denominan FKBPs (por FK506 binding proteins) a una subfamilia de proteínas pertenecientes a la familia de las inmunofilinas (IMMs). Las FKBPs son capaces de unir al macrólido inmunosupresor FK506, y como toda IMM de la familia, también se caracterizan por presentar un dominio que posee actividad enzimática de peptidil-prolil (cis/trans) isomerasa (PPIasa). La actividad enzimática de PPIasa favorece su acción biológica de chaperona molecular sobre proteínas plegadas. Es decir, las IMMs pueden funcionar como interruptores moleculares y generar consecuentemente cambios en diferentes vías de señalización. Esta capacidad las convierte en posibles blancos farmacológicos para modular diversos procesos biológicos, y en objeto de estudios prometedores dentro del campo de las ciencias biológicas y biomédicas. La droga FK506, además de tener acción inmunosupresora, inhibe la actividad enzimática intrínseca de PPIasa de las FKBPs cuando se encuentra en asociación con el dominio PPIasa. Este dominio es característico de la familia de las IMMs, y aquellos miembros de alto peso molecular poseen motivos adicionales que les confieren funciones biológicas complementarias. Este trabajo de tesis doctoral se centra en el estudio de dos FKBPs de alto peso molecular, FKBP51 y FKBP52. Ambas IMMs, cuentan con repeticiones de secuencias tetratricopeptídicas repetidas en tándem (los dominios TPR) que les posibilitan interactuar con proteínas de choque térmico tales como la Heat-Shock Protein de 90-kDA, Hsp90, una chaperona que forma heterocomplejos multiméricos con una gran variedad de proteínas-cliente, muchas de ellas esenciales para vida.

FKBP51 y FKBP52 fueron las primeras IMMs de su subfamilia en ser identificadas como moduladoras de los receptores de esteroides (RE). Nuestro laboratorio ha participado en el estudio y el esclarecimiento del mecanismo de regulación de los RE por proteínas FKBPs y Hsps. En tal sentido, FKBP51 y FKBP52 han sido reconocidas como necesarias para el control de la actividad los receptores de andrógenos (AR), estrógenos (ER), glucocorticoides (GR), progesterona (PR) y mineralocoriticoides (MR). A pesar de que FKBP51 y FKBP52 presentan una alta identidad de secuencia y similitud estructural, en general desempeñan roles antagónicos en la regulación de la acción biológica de los RE. FKBP52 es un regulador positivo de los RE; mientras que FKBP51 funciona como regulador negativo (con excepción de AR que es estimulado por ambas FKBPs por igual).

El modelo general de activación de los RE indica que, en ausencia de hormona, el receptor se encuentra mayoritariamente en el citoplasma. El heterocomplejo del que participa está formando por las chaperonas Hsp90 y Hsp70, junto con proteínas cochaperonas como FKBP51. En presencia de hormona, se desencadenan una serie de cambios en la composición del heterocomplejo, que involucran el intercambio de FKBP51 por FKBP52 en el sitio aceptor del dímero de Hsp90 unido a los RE. FKBP52 es reclutada por la unión del esteroide e interactúa con la proteína motora dineína, lo cual posibilita el transporte activo del heterocomplejo al núcleo y, en consecuencia, la regulación de la expresión genes de respuesta a hormonas esteroideas. Debido a que mutantes del factor proapoptótico p53 poseen una localización primariamente citoplasmática en células no estimuladas y se asocian a Hsp90, primero se planteó la posibilidad y luego se demostró que las mutantes de p53 son reguladas de manera análoga a los RE. El modelo de transporte propuesto por nuestro laboratorio para la activación de los RE y p53 nos llevó a pensar en la posibilidad de que otros factores de transcripción que presenten un requerimiento de relocalización subcelular equivalente como parte de su mecanismo de acción, podrían llegar a utilizar la misma maquinaria molecular asociada a las IMMs. Es así que, de forma análoga a los RE, el factor de transcripción NF-κB se encuentra inactivo en el citoplasma y es trasportado en forma activa al núcleo por el complejo motor de dineína/dinactina, siendo por ende un candidato interesante para analizar. NF-kB es un factor de transcripción dimérico que cumple un rol crítico en la regulación de la inflamación, inmunidad, proliferación celular, diferenciación, desarrollo y supervivencia. Su desregulación se encuentra asociada a patologías inflamatorias, enfermedades neurológicas, y principalmente, a tumores sólidos y neoplasias hematológicas. El dímero más abundante y activo de NF-kB en mamíferos está formado por las subunidades RelA/p65 y p50. Dadas las evidencias arriba comentadas con los RE, por los experimentos preliminares que resultaron positivos, y la experiencia previa del laboratorio en el estudio de IMMs, nos planteamos la hipótesis de que FKBP51 y FKBP52 podrían regular la función biológica de NF- κ B.

Los hallazgos alcanzados a lo largo de esta tesis demostraron que FKBP52 tiene un efecto estimulante sobre la acción biológica de NF-kB. FKBP52 participa de diferentes hitos en la activación del factor de transcripción e interactúa con la subunidad p65. Asimismo, resultados obtenidos con mutantes puntuales de FKBP52 sin actividad enzimática y por inhibición farmacológica de la actividad PPIasa, han demostrado que la acción de FKBP52 sobre NF-κB es dependiente de su actividad enzimática, una regulación que se evidenció tanto en fibroblastos embrionarios como en células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda.

De forma análoga a lo descubierto para los RE, este trabajo contribuyó a demostrar que FKBP51 es un modulador negativo de NF- κ B y que es capaz de interactuar con la subunidad p65, tanto en células Hek293T como en Jurkat. A diferencia de lo evidenciado para FKBP52, la actividad PPIasa de FKBP51 no participa de la regulación del factor de transcripción, sino la IMM en sí misma. En estudios previos del laboratorio, se había demostrado que FKBP51 es un nuevo factor mitocondrial con propiedades antiapoptóticas. En línea con esos antecedentes, los experimentos realizados en esta tesis demostraron que FKBP51 es un actor estimulante de la proliferación y la supervivencia celular. No obstante, en esta tesis también se demuestra que estos efectos podrían ser la consecuencia de la acción de las IMMs sobre otra familia de factores de transcripción como los de la familia E2F, los que actúan de manera coordinada con NF- κ B regulando a genes involucrados en la progresión de ciclo celular y apoptosis.

Los descubrimientos realizados en este trabajo doctoral proponen que la actividad PPIasa de FKBP52 podría ser un blanco farmacológico para inhibir la acción de NF-κB con un fin terapéutico en aquellas patologías donde la activación de este factor de transcripción se encuentre desregulada. Adicionalmente, se formula que FKBP51 muestra en general propiedades como agente pro-proliferativo y antiapoptótico.

Palabras clave:

FKBP52, FKBP52, NF-κB, PPlasa.

<u>Title</u>: Study of high molecular weight immunophilins as modulators of the biological action of NF-*k*B

Abstract

<u>FK506 binding proteins</u> (FKBPs) belong to a group of immunophilins (IMMs) capable of binding the immunosuppressive macrolide FK506. IMMs are characterized for having peptidyl-prolyl (cis/trans) isomerase (PPIase) enzymatic activity. The enzymatic activity of PPIases allows IMMs to act as molecular chaperones of folded proteins. For this reason, IMMs can function as molecular switches and modify different signaling pathways. This ability transforms this family of proteins into possible pharmacological targets to alter various biological processes and a promising object of study for biological and biomedical sciences. Besides having immunosuppressant action, when FK506 is associated to FKBPs, it functions as a potent inhibitor of their intrinsic PPIase activity.

High molecular weight FKBPs have at least one domain with the characteristic enzymatic PPIase activity of their family of proteins, and additional motifs that can grant them supplementary biological functions. This PhD thesis is focused on the study of two specific high molecular weight FKBPs, FKBP51 and FKBP52. Both IMMs, have tetratricopeptide domains (TPR), additional to their domain with enzymatic activity that confers them the ability to interact with heat shock proteins (Hsps).

FKBP51 and FKBP52 have been the first proteins of their family to be identified as regulators of the biological action of steroid receptors (SR). Our laboratory has participated in the study and the enlightenment of the regulation of SR by FKBPs and Hsps. Thus, FKBP51 and FKBP52 have been recognized as necessary actors for the control of the activity of the androgen (AR), estrogen (ER), glucocorticoid (GR), progesterone (PR) and mineralocoriticoides (MR) receptors. In general, although FKBP51 and FKBP52 have high identity of sequence and structural similarity, they perform antagonist roles in the regulation of the SR action. While FKBP52 is a positive regulator of the SR, FKBP51 functions as a negative regulator (except for AR that is stimulated equally by both IMMs). The accepted model for the activation of de SR, indicates that in absence of hormone, the receptor forms an heterocomplex that is mostly located in the cytoplasm. The heterocomplex is formed by the chaperones Hsp90 and Hsp70, in association to co-chaperones like FKBP51. After the stimulation with hormone,

several changes in the complex composition are triggered that involve the exchange of FKBP51 by FKBP52. FKBP52 interacts with the motor protein dynein, thus allowing the active transport of the SR to the nucleus and the regulation of gene expression by steroid hormones.

The proposed model by our laboratory for the activation of the SR lead to the idea that it could be possible that other transcription factors showing a similar subcellular translocation process, may use the same molecular mechanism as the SR. Analogously, to the SR, the transcription factor NF- κ B is inactive in the cytoplasm and is actively transported to the nucleus by the motor complex dynein/dynactin. NF- κ B is a dimeric transcription factor that has a critical role in the regulation of inflammation, immunity, cellular proliferation, differentiation, development and survival. Its deregulation is associated to inflammatory pathologies, neurological diseases, and mainly, solid tumors and hematological malignancies. The most abundant and active dimer of NF- κ B in mammals is formed by the subunits RelA/p65 and p50.

Altogether, the known evidences and the previous experience of the laboratory in the study of IMMs lead to propose the hypothesis of this PhD thesis that postulates that FKBP51 and FKBP52 regulate the biological action of NF-κB.

The findings reached throughout this thesis demonstrate that FKBP52 has a positive effect over the biological action of NF- κ B. This IMM participates in different hallmarks in the activation of the transcription factor, and it interacts with the subunit p65. Likewise, the results obtained with point mutants of FKBP52 without enzymatic activity and with the pharmacological inhibition of the PPIase activity, have demonstrated that the action of FKBP52 on NF- κ B depends on its enzymatic activity. Most of these results also suggest that this regulation is present in the two human cell lines used in this work, Hek293T (embryonic fibroblasts) and Jurkat (acute T cell leukemia).

Analogously to that discovered for the SR, this work has contributed to demonstrate that FKBP51 is a negative modulator of NF- κ B in Hek293T cells and is capable of interacting with p65 subunit, both in Hek293T cells and Jurkat. Besides the findings made for FKBP52, the PPIase activity of FKBP51 does not participate in the regulation of the transcription factor. The experiments performed also showed that the IMM FKBP51 is a stimulating factor of cellular proliferation and survival. These effects could be a consequence of the findings made in this thesis about another family of transcription factors that regulate cell cycle progression and apoptosis in coordinate

fashion with NF-kB, the family E2F.

. The discoveries made in this PhD work propose that the PPIase enzymatic activity of FKBP52 could be a new pharmacological target for the inhibition of NF-kB with a therapeutic goal in those pathologies where this transcription factor is deregulated, especially in hematological neoplasms. Additionally, it is postulated that FKBP51 might be pro-proliferative and antiapoptotic agent.

Key words:

FKBP51, FKBP52, NF-KB, PPlase.

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis doctoral es el resultado del esfuerzo de muchas personas que contribuyeron de diversas formas a su realización. Esta sección es para brindarles el merecido reconocimiento.

Mi primer agradecimiento es para mis directores, mi director, **Mario**, y mi codirectora, **Alejandra**. Les agradezco por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y formar parte de su equipo. Ambos me mostraron el significado de hacer ciencia. Alejandra estuvo en la mesada conmigo desde comienzo, cuando todavía no sabía pipetear y con ella aprendí muchas de las técnicas que me permitieron hacer esta tesis. Tengo que agradecerles, no solo la vocación de ambos por transmitir su conocimiento, sino también la libertad que me han dado para trabajar en el laboratorio, para intercambiar ideas con ellos, para hacer mi propia experiencia y cometer mis propios errores (y por la paciencia). Es una experiencia muy grata trabajar con ambos.

Sin la ayuda y colaboración de mis **compañeros de laboratorio**, este trabajo no hubiera sido posible. En especial, gracias por hacer del laboratorio todos los días un lugar agradable de trabajo en equipo. Muchas gracias a **Gisela, Fernanda, Fernando, Gabriel, Ana, Anita y a Alejandro** por toda su ayuda. Agradezco a las chicas del **IByME** que siempre me recibieron con los brazos abiertos cuando necesité usar sus mesadas; en especial a **Nadia** por su asistencia y sus protocolos de laboratorio.

El departamento de Química Biológica no solo me brindó mucho del equipamiento necesario para desarrollar esta tesis, sino también me permitió poder seguir trabajando durante los últimos meses y completar mi trabajo doctoral, aun sin beca. He recibido asistencia de innumerable cantidad de becarios e investigadores, que me tendieron una mano cuando no tenía los equipos, los reactivos o el conocimiento necesario para llevar a cabo una idea. Tengo que agradecer especialmente al grupo del Dr. Monte, a Julieta y Fátima por prestarnos plásmidos, reactivos y su ayuda en el desarrollo de experimentos. Al laboratorio de los Drs. Compagno y Laderach, en especial a Enrique, Lucas y Gustavo, que en varias oportunidades destinaron tiempo para ayudarme a aprender técnicas y poner a punto experimentos. El laboratorio de la Dra. Vazquez, el Dr. Cánepa, la Dra. Guberman, Dra. García, Dra. Kotler, entre muchos otros, nos han

facilitado en incontables veces muchos de los equipos que se usaron en esta tesis, además de su asistencia. Gracias a todos los **bedeles**, y especialmente a Eva, Pato, Sole, Marce y Nadia, con quienes compartí los últimos meses y me han soportado durante la escritura.

Mi consejera de estudios, la **Dra. Pecci**, ha sido de muchísima ayuda. Agradezco su buena predisposición para ser mi consejera. Siempre estuvo atenta para que pudiera cumplir con todos los trámites y me brindó consejo cuando fue necesario. Su aporte y el de la comisión de seguimiento, conformado por las **Dras. De Siervi y Galleano**, fue de gran ayuda para refinar la escritura de este trabajo.

Muchas gracias a todos los que aceptaron amablemente ser propuestos como jurado de tesis, y en particular, a los **jurados** por todo el tiempo dedicado en la lectura de este trabajo.

Sin embargo, la ayuda más importante que recibí, se la debo a **mi familia**. El apoyo incondicional de mis papás desde que decidí estudiar biología me permitió tener la seguridad y la fuerza para llegar hasta este momento. Sin ellos no hubiera podido hacer esta carrera. Muchas gracias por acompañarme en este camino. Muchas gracias **mamá**, **papá**, **Edu y Andy** por todos los consejos brindados y el interés en mi trabajo. Y, por último, gracias **Nacho** por todo el cariño, la ayuda, la compañía y la motivación que me regalás todos los días.

A todos, Muchas Gracias.

Producción científica

Algunos de los hallazgos presentados en este trabajo formaron parte de la siguiente publicación original:

• NF-kB transcriptional activity is modulated by FK506-binding proteins FKBP51 and FKBP52: a role for peptidyl-prolyl isomerase activity.

Erlejman AG, <u>De Leo SA</u>, Mazaira GI, Molinari AM, Camisay MF, Fontana V, Cox MB, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD.

J Biol Chem. 2014 Sep 19;289(38):26263-76. doi: 10.1074/jbc.M114.582882. Epub 2014 Aug 7.

Adicionalmente, parte de estos descubrimientos fueron plasmados en dos reviews:

• Regulation of NF-kB signalling cascade by immunophilins.

Lagadari M, <u>De Leo SA</u>, Camisay MF, Galigniana MD, Erlejman AG. *Current Molecular Pharmacology*, 2016, 9, 99-108. *Epub* 2015. *doi:* 10.2174/1874467208666150519113833

• Biological relevance of Hsp90-binding immunophilins in cancer development and treatment.

Mazaira GI, Camisay MF, <u>De Leo S</u>, Erlejman AG, Galigniana MD. International Journal of Cancer. 2016 Feb 15;138(4):797-808. doi: 10.1002/ijc.29509. Epub 2015 Mar 24.

La publicación de los resultados correspondientes a los Capítulos 1 y 2 de la presente tesis doctoral se encuentra en etapa de finalización (escritura):

• NF- κ B stability and transcriptional activity is enhanced by the isomerase FKBP52.

<u>De Leo, S.A</u>; Camisay M.F; Galigniana, M.D; Erlejman A.G. J *Biol Chem.*

En el marco de una colaboración con el Laboratorio de la Dra. Ana Rojas (Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos, CONICET) se realizaron ensayos biológicos que fueron publicados en:

Antioxidant Japanese plum (*Prunus salicina*) microparticles with potential for food preservation.

Basanta, M. F; Marin, A; <u>De Leo, S.A</u>; Gerschenson, L.N; Erlejman, A.G; Tomás-Barberán, F.A; Rojas, A.M.

Journal of Funtional Foods, 2016, vol. 24 p. 287 – 287. doi:10.1016/j.jff.2016.04.015

<u>Índice</u>

Resumen	3
Palabras clave:	5
Abstract	6
Key words:	8
Agradecimientos	9
Producción científica	11
Índice	12
Abreviaturas	16
Introducción	18
Inmunofilinas	18
Ciclofilinas	19
Parvulinas	20
FKBPs	21
Estudio de la actividad PPIasa	22
FKBP51 у FKBP52	23
El modelo de activación de los receptores de esteroides	26
Los dominios TPR de FKBP51 y FKBP52	29
El dominio FK1 de FKBP51 y FKBP52	30
El dominio FK2 de FKBP51 y FKBP52	32
Rol de FKBP51 y FKBP52 en la neurodiferenciación y en enfermedades del sistema nervioso	33
La importancia de FKBP51 y FKBP52 en cáncer	34
El factor de transcripción NF-κB	37
La familia de factores de transcripción NF-κB	37
Las proteínas IkB	39
El complejo de quinasas IKK	40
La vía canónica de señalización de NF-κB	41
Modificaciones post-traduccionales de NF-κB	44
El rol de NF-κB en cáncer	45
Inhibición farmacológica de NF- κ B como acercamiento terapéutico para el tratamiento de c	áncer.
	48
La familia de factores de transcripción E2F	49
Antecedentes	50
Materiales y Métodos	53

Materiales	53
1. Líneas celulares	53
2. Plásmidos	53
3. Anticuerpos	55
3. Enzimas	56
4. Medios y complementos de cultivo celular	56
5. Primers	57
6. Kit comerciales	57
7. Extracción de ARN	57
8. Reactivos generales	57
Métodos	60
1. Obtención de plásmido	60
1.a Preparación de Bacterias Competentes	60
1.b Transformación de Bacterias Competentes	60
1.c Determinación de bacterias transformadas: Miniprep	61
1.d Purificación de plásmido: Midiprep	62
2. Cultivo celular	62
2.a Línea celular Hek293T y Hek293	62
2.b Líneas celulares estables: generación y cultivo	63
2.c Línea celular Jurkat	63
3. Transfección	63
3.a Transfección por el método de precipitación con fosfato de calcio	63
3.b Transfección con PEI	64
4. Determinación de la actividad transcripcional de NF-κB y de E2F	64
4.a Determinación de la actividad enzimática de luciferasa	
4.b Determinación de la actividad enzimática de eta -galactosidasa	
4.c Calculo de la actividad transcripcional	
5. Preparación de fracciones totales de proteínas para Western blot	68
5.a Determinación de proteínas totales por el método de Bradford	
5.b Tratamiento con fosfatasa alcalina	69
8. Ensayo de Western blot	69
8.a Preparación de muestras para Western blot	69
8.b Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-page	69
8.c Transferencia	
8.d Incubación con anticuerpos	
8.e Revelado	71

8.f Ensayo de Western blot modificado para la detección de proteínas fosforiladas.	71
9. Inmunofluorescencia Indirecta	.71
10. Co-inmunoprecipitación	.74
11. Ensayo de ubiquitinación	.75
12. Determinación de la expresión de ARNm	.77
12.a. Extracción de ARN total	77
12.b Retrotranscripción (RT-PCR)	78
12.c PCR en tiempo real (qPCR)	78
12.d. Cálculo de las veces de inducción de la expresión ARNm blanco respecto de actina y relativo la condición control	o a 82
13. Evaluación de la viabilidad celular con el ensayo de MTT	.83
14. Ensayos de proliferación celular	.83
14.a Recuento de células viables	83
14.b Ensayo de proliferación con la sonda CFSE	84
15. Análisis de la expresión génica con microarreglo.	.85
15.a Preparación de muestras biológicas y extracción de ARN	.85
15.b Microarreglo de expresión	86
15.c Análisis estadístico del microarreglo de expresión.	87
16. Análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la proteína p65 humana	.89
Hipótesis y Objetivos	.99
Hipótesis	.99
Objetivos generales	.99
Objetivos particulares1	100
Capítulo 1:1	102
Modulación de NF-κB por <i>FK506-binding protein 52-kDa</i> 1	102
Evaluación de la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF- $lpha$.03
Influencia de la actividad enzimática de PPIasa de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de Ν κB1	NF- 104
Efecto del dominio TPR de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B1	.08
Estudio del efecto de FKBP52 sobre la fosforilación y la degradación de ΙκΒα1	.12
Evaluación de p65 total y p65 fosforilada en Ser5361	.14
Efecto de la actividad PPIasa de FKBP52 sobre los niveles proteicos de p65 total y p-p65 Ser536. 1	.18
Evaluación temporal del efecto de FKBP52 sobre p-p65 Ser5361	.20
Efecto de la sobreexpresión de FKBP52 y de su actividad PPIasa sobre el transporte nuclear de pé	65. .23
Los niveles proteicos de p65 son regulados por ubiquitinación y degradación proteasomal 1	.27
Estudio de la estabilidad de p65 en células que sobreexpresan FKBP521	.30

Expresión de genes regulada por NF-κB132
Evaluación de la interacción de p65 con FKBP52 en células Jurkat
Efecto de FK506 sobre Metaloproteasa 9 en células Jurkat
Capítulo 2:
Modulación de NF-κB por <i>FK506-binding protein 51 kDa</i> 137
Evaluación de la actividad transcripcional de NF- κ B en respuesta a TNF- $lpha$
Estudio del efecto de la actividad PPIasa de FKBP51 en la activación transcripcional de NF- κ B 139
Efecto del dominio TPR de FKBP51 sobre la activación transcripcional de NF- κ B
Estudio del efecto de FKBP51 sobre la fosforilación y degradación de ΙκΒα
Evaluación de p65 total y p65 fosforilada en Ser536148
Evaluación temporal del efecto de FKBP51 sobre la fosforilación de p65 en Ser536 150
Efecto de FKBP51 sobre la translocación nuclear de p65152
Expresión de genes blanco de NF-κB155
Evaluación de la interacción de p65 con FKBP51 en células Jurkat
Capítulo 3:
Estudio del rol de FKBP51 y FKBP52 en proliferación y muerte celular158
Estudio del efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre la proliferación celular
Estudio del efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre la muerte celular.
Estudio de la expresión diferencial de genes entre Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo con un microarreglo de expresión
Discusión
Bibliografía210

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

- AR: Receptor de andrógenos
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- BSA: seroalbúmina bovina
- CC50: Concentración citotóxica 50%
- CFSE: carboxi-fluoresceína succinimidil éster
- CHIP: <u>Carboxyl terminus of Hsc70-Interacting Protein</u>
- ChIP: Chromatin Immunoprecitiptation
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- E2F: Factor de transcripción E2F
- ER: Receptor de estrógenos.
- ES: Error estándar
- EST: Estaurosporina.
- FKBP51: FK506 binding protein 51 kDa.
- FKBP52: <u>FK</u>506 <u>b</u>inding <u>p</u>rotein <u>52</u> kDa.
- FKBPs: FK506 binding proteins
- GADPH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GR: Receptor de glucocorticoides
- hFKBP: FKBP humana
- Hsp70: <u>Heat shock protein of 70 kDa.</u>
- Hsp90: <u>Heat shock protein of 90 kDa.</u>
- IKK: *IκB kinase*, quinasa de ΙκΒ.
- IκB: Inhibitor of κB
- IMM: Inmunofilina
- ING-4: Inhibitor of growth protein 4
- LPS: lipopolisacárido
- M: Mouse

MKRN: Makorin ring-zinc-finger protein

MMP-9: Metaloproteasa 9

MR: Receptor de mineralocorticoides

MTT: sal bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NF-κB: <u>N</u>uclear <u>f</u>actor - <u>κB</u>.

nt: nucleótidos

plκB: Inhibitor of κB fosforilado

p-p65 ser536: factor de transcripción p65 fosforilado en serina 536.

PCR: Protein Chain Reaction, Reacción en cadena de polimerasa.

PMA: forbol-12-miristato-13-acetato

PPAR- γ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ

PPlasa: peptidil-prolil isomerasa

PR: Receptor de progesterona

qPCR: PCR cuantitativa.

R: Rabbit

Rapa: rapamicina

RE: receptores de esteroides

RIN: RNA Integrity Number

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Rpm: revoluciones por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RSK1: Ribosomal S6 Kinase 1

ser536: serina 536

shRNA: short hearpin ARN

SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1

TNF- α : <u>Tumor n</u>ecrosis <u>factor</u> - α

TPR: Tetratricopeptide repeat, Repeticiones de tetratricopéptidos.

U.A: unidades arbitrarias

Introducción

Las proteínas pertenecientes a la subfamilia de inmunofilinas FKBPs (*FK506-binding proteins*) integran una familia más amplia de proteínas con actividad enzimática de peptidil-prolil-(*cis/trans*)-isomersa, las que además unen drogas inmunosupresoras, y de ahí su nombre de inmunofilinas.

Inmunofilinas

Las inmunofilinas son una familia de proteínas intracelulares que se caracterizan por unir drogas inmunosupresoras, a partir de las cuales reciben su nombre. El dominio que une a la droga tiene además la propiedad de poseer actividad enzimática de peptidilprolil (cis/trans)-isomerasa (PPlasa), la que se ve inhibida en presencia de la droga inmunosupresora. La mayoría de los enlaces peptídicos presentan una conformación dominante en trans como consecuencia de impedimentos estéricos que ocurren entre los carbonos α si la conformación fuera cis. Por el contrario, la cadena lateral circular de los residuos de Prolina permite tanto una conformación cis como trans del enlace peptídico que le precede, el cual típicamente se encuentra en una relación 20% cis a 80% trans (1). La isomerización cis/trans del enlace peptídico precedente a una prolina (o enlace X-Pro, ver Figura I.1) es un paso limitante del plegamiento proteico catalizado por proteínas con actividad de PPlasa que no requiere gasto de ATP ni la unión de cofactores (1-3). Como consecuencia de la acción de proteínas con actividad PPlasa, se modifica el plegamiento de proteínas-cliente que incluyen péptidos nacientes y proteínas maduras. El cambio conformacional inducido puede tener un efecto importante sobre la actividad biológica de las proteínas-cliente con las que la IMM interactúa, y/o sobre su interacción con otros factores cuando la IMM forma parte de complejos oligoméricos (2, 3).



cis Ala-Pro



trans Ala-Pro

Figura I.1: Isomerización *cis/trans* de un enlace Ala-Pro. Las proteínas con actividad PPIasa son catalizadoras de la isomerización reversible de enlace peptídicos del tipo X-Pro. Fuente: Dunyak *et.al.* (1). Una característica relevante de las IMMs es que actúan como receptores intracelulares solubles de drogas inmunosupresoras, y que la asociación a la droga implica a su vez la inhibición de la actividad enzimática intrínseca de PPIasa.

Las inmunofilinas se clasifican en dos grupos diferentes según el tipo de droga inmunosupresora que reconocen: a) La subfamilia FKBP (*FK506-Binding Protein*) interactúa con los macrólidos FK506 (Tacrolimus) y rapamicina (Sirolimus), b) La subfamilia de las Ciclofilinas (CyPs) une el undecapéptido cíclico ciclosporina A. La unión de estas drogas al dominio PPIasa inhibe la actividad PPIasa de CyPs y FKBPs. Existe un tercer grupo de proteínas con actividad PPlasa que no tiene la capacidad de interactuar con drogas inmunosupresoras, que recibe el nombre de Parvulinas. Tanto las FKBPs, las CyPs y las Parvulinas, se encuentran conservadas a lo largo de Eucariotas, Procariotas y Archaea. En las levaduras existen 8 CyPs, 4 FKBPs y una Parvulina, mientras que en humanos hay 18 Ciclofilinas, 16 FKBPs y 2 Parvulinas (2). Desde el descubrimiento de la primer proteína con actividad PPlasa aislada en 1984 a partir de un homogenato de hígado de cerdo (4), se han descubierto numerosos procesos biológicos en los que este grupo de enzimas participa de manera activa. El estudio del mecanismo catalítico exacto de la isomerización de un enlace X-Pro por enzimas con actividad PPlasa permaneció esquivo por razones de falta de métodos (3), y ha sido elucidado sólo en los últimos años (5).

Ciclofilinas

Las Cyps unen al undecapéptido inmunosupresor ciclosporina A (equivalentes comerciales: Gengraf, Neoral y Sandimmune). Las proteínas de la familia de las CyPs comparten el dominio ciclofilina con actividad PPIasa. CyPA/Cyp17 es la CyP arquetípica y la más abundante en células de mamífero. (6). CyPA cuenta únicamente con el dominio enzimático de unión a la droga; sin embargo, al menos 10 CyPs humanas son proteínas multi-dominio conformadas por el dominio PPIasa de las CyPs más dominios adicionales con roles regulatorios y/o de señalización (6). Entre estos últimos se encuentran, dominios de repeticiones de tetratricopéptidos (TPR) con capacidad de interacción con chaperonas, motivos de reconocimiento de ARN (RRM), dominios ricos en arginina-(RS) dominios U-box con actividad E3-ligasa (6). ΕI serina V complejo CyPA•cicloscoporina ha sido responsabilizado por el efecto inmunosupresor de la droga ciclosporina-A debido a que el complejo IMM•droga (y no cada uno individualmente) inhibe la translocación nuclear del factor de transcripción NFAT (Nuclear Factor of

Introducción

Activated T cells), y por ende la subsecuente producción de citoquinas. El complejo CyPA•ciclosporina interactúa con la serina/treonina-fosfatasa PP2B/calcineurina e inhibe su actividad, resultando en una disminución de la actividad de NFAT al no ser éste desfosforilado y quedar entonces atrapado en el citoplasma (7, 8). Evidencia reciente reporta que existe una interacción entre CyPA y el factor de transcripción NF- κ B, así como un efecto de CyPA sobre la estabilidad de la subunidad p65 de NF- κ B y de su localización nuclear (9). Adicionalmente, existen CyPs extracelulares (eCyPs) que actúan como factores pro-inflamatorios y se ven implicados en ciertas enfermedades inflamatorias (10).

Parvulinas

Las parvulinas son un grupo de proteínas pequeñas (en latín parvulus: muy pequeño) con actividad PPlasa, las que a diferencia de las FKBPs y Cyps, no unen drogas inmunsupresoras. A pesar de ello, la naftoquinona natural juglona inhibe su actividad enzimática mediante un mecanismo inespecífico que involucra la modificación de grupos sulfhidrilo presentes en residuos de cisteína (11). En Eucariotas, estas proteínas contienen el dominio PPIasa característico de la familia, con una secuencia intermediaria y un dominio WW N-terminal, con alta capacidad de unión a motivos ricos en residuos Prolina (6). Entre las proteínas con actividad PPlasa, las Parvulinas son las únicas que exhiben preferencia por el reconocimiento de motivos fosforilados para ejercer su actividad enzimática. La parvulina más estudiada en humanos es Pin1, la cual se une a una secuencia aminoacídica determinada de fosfo-Serina o fosfo-Treonina/Prolina. (p-Ser/p-Thre-Pro), lo que facilita el estudio de sus proteínas blanco (12). Pin 1 interactúa con un gran número de proteínas clave involucradas en diferentes procesos celulares, como ciclina D1, ciclina E, p53, β-catenina, el precursor amieloide APP, Tau1, CDC25, jun, MDM2, c-Raf, AKT y la subunidad p65 de NF-κB, entre otras (12). Ha sido demostrado que Pin1 es importante en la regulación de la estabilidad de p65. La sobreexpresión de Pin1 favorece la acumulación de p65 por inhibición de su degradación mediada por la maquinaria proteosomal, y estimula su actividad transcripcional evaluada en ensayos de gen reportero. Adicionalmente, se ha identificado gracias al uso de mutantes puntuales de p65, que Pin1 interactúa con los aminoácidos fosfo-Treonina 254-Prolina 255 de p65, y que su acción sobre p65 podría estar mediada por una isomerización en estos residuos (13).

FKBPs

La familia de FKBPs en humanos está conformada por 16 miembros, los cuales han sido nombrados por su peso molecular aparente. La FKBP de 12-kDa, FKBP12, es la FKBP arquetípica que cuenta con un único dominio, el domino FK con actividad PPlasa característico de la familia. FKBP12 ha sido reportada como responsable de la actividad inmunosupresora del macrólido FK506, ya que el complejo FKBP12•FK506•Calcineurina inhibe la actividad de la proteína-fosfatasa calcineurina (o PP2B) y, en consecuencia, inhibe la translocación nuclear y por ende la actividad transcripcional del factor de transcripción NFAT (14, 15). De similar forma, el complejo FKBP12•rapamicina inhibe la actividad de proteína-quinasa de mTOR (mammalian Target of Rapamycin), una de las proteínas responsables del control del ciclo celular, la proliferación y la muerte celular (16). Tanto rapamicina como FK506 interactúan en un extremo con FKBP12, y con mTOR o calcineurina por otra región, respectivamente según se ha demostrado en estructuras cristalográficas (17). A pesar de que FKBP12 ha sido descripta como responsable única del efecto inmunosupresor de la rapamicina, evidencias más recientes muestran que FKBP12 no es la única FKBP capaz de formar complejos con rapamicina y mTOR con efecto inhibitorio sobre la actividad quinasa de mTOR. De hecho, otros miembros de la subfamilia como FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51 y FKBP52 podrían formar parte del complejo mTOR•rapamicina e inhibir la actividad quinasa in vivo, aunque con menor afinidad por rapamicina que FKBP12. Ensayos con células knock-out para FKBP12 indican que FKBP51 podría sustituir a FKBP12 en el efecto de rapamicina sobre la actividad quinasa de mTOR (18), aunque lo hace a niveles proteicos no compatibles con los fisiológicos, por lo que esta observación ha sido altamente cuestionada. No obstante, FKBP51 sí regula al componente mTORC1 de la subunidad RAPTOR asociada a mTOR ((18)

Doce de las proteínas FKBP humanas conocidas, están compuestas por dominios múltiples, encontrándose presente al menos un dominio FK característico de la familia (el que une físicamente a la droga dentro del dominio PPIasa y usualmente son usados como sinónimos) y motivos adicionales que incluyen los dominios EF de unión a iones calcio y dominios TPR (6). Dentro de las proteínas FKBP con dominios TPR, también llamadas por ello FKBPs de alto peso molecular para diferenciarlas de las que sólo poseen el dominio FK (como FKBP12), se encuentran: FKBP36, FKBP37, FKBP38, FKBP44, FKBP51 y FKBP52.

Introducción

FKBP51 y FKBP52 presentan alto grado de homología entre sí, y se caracterizan por la presencia de dos dominios FK en serie, FK1 y FK2, de los cuales, únicamente el dominio FK1 presenta actividad PPIasa y es capaz de ser inhibido por FK506; mientras que el dominio FK2 no muestra actividad enzimática y posee la capacidad de unir nucleótidos (también llamado por ello, "sitio ATP" de la inmunofilina). A pesar de la alta similitud estructural entre el dominio PPIasa de FKBP38 y FKBP12, la primera no posee actividad PPIasa en ausencia de la interacción con calcio•calmodulina. Solo luego de la formación del complejo calcio•calmodulina•FKBP38, FKBP38 exhibe actividad enzimática de PPIasa (19). A pesar de esta particularidad, FKBP38 tiene un rol biológico importante como proteína de andamiaje para el factor antiapoptótico Bcl-2 en mitocondrias (19), y como regulador de la vía de señalización de mTOR (20).

Estudio de la actividad PPlasa

La actividad enzimática de PPIasas puede ser cuantificada sólo *in vitro* en sistemas libres de células, utilizándose péptidos cromogénicos como sustratos. El primer ensayo diseñado para estudiar la actividad PPIasa se realizó por un método enzimático acoplado a una proteasa. La especificidad de la actividad de la proteasa quimiotripsina por enlaces X-Pro en configuración *trans*, permitió la determinación de la actividad PPIasa catalizada por una enzima en el péptido cromogénico succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-4 nitroanilida (21). A partir de este tipo de experimentos realizados con diferentes péptidos sintéticos y variaciones en su secuencia aminoacídica, se ha podido elucidar que existe cierta preferencia de las IMMs por secuencias blanco. Las CyPs tienen alta capacidad catalítica con poca especificidad de sustrato con relación al residuo anterior y posterior a una Pro. Por otro lado, las FKBPs muestran predilección por prolinas en un ambiente hidrofóbico; mientras que la parvulina humana Par14, tiene preferencia por residuos cargados positivamente cercanos a una prolina (21).

La participación de isomerización de enlaces X-Pro en procesos celulares a nivel molecular no es posible de ser estudiada en ensayos funcionales en células o sistemas reconstituidos. La única metodología que hasta el momento permite el estudio conformacional de un enlace precedente a una prolina en configuración *cis* o *trans* en una proteína es por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Ésta se restringe a proteínas pequeñas, o fragmentos proteicos, y no permite el estudio de enlaces de prolina en un contexto celular (21). En el caso de la parvulina humana Pin1, existe un motivo específico de reconocimiento sobre las proteínas blanco (p-Ser/p-Thr–

Pro), sencillamente identificable, lo que ha simplificado su estudio. Actualmente, se han identificado numerosas vías de señalización reguladas por isomerizaciones de enlaces X-Pro catalizadas por Pin1.

Una estrategia indirecta utilizada para el estudio de isomerizaciones de enlaces precedentes a una prolina en ensayos funcionales y en un contexto celular, consiste en la generación de mutantes puntuales de la proteína blanco en el residuo prolina candidato a ser modificado por isomerización. Frecuentemente, esta estrategia también es utilizada para corroborar la isomerización detectada por RMN.

Existe cierta complejidad para hallar la isomerización *cis/trans* de un único enlace X-Pro en una proteína. A pesar de ello, se han podido identificar varias isomerizaciones por RNM combinada con mutagénesis en residuos de prolina de proteínas plegadas que funcionan como interruptores moleculares en las células. Estos casos incluyen a Itk2 (interleuquina 2- tirosin quinasa), el receptor de tipo 3 para 5-hidroxi-triptamina (5-HT₃), el receptor nicotínico de acetilcolina (nAchR), la proteína de fago g3p involucrada en el proceso de infección, y la proteína reguladora de quinasas CT10 (c-CrkII). También se encuentran otras proteínas propuestas como interruptores moleculares de enlaces X-Pro identificadas por RMN, pero que aún no ha sido aceptado que contribuyan a algún proceso de señalización: Hsp70 y su homólogo DnaK en bacterias, y la proteína ribosomal L11 (21).

FKBP51 y FKBP52

Como se ha expuesto con anterioridad, FKBP51 y FKBP52 son dos IMMs de alto peso molecular que comparten 60% de identidad y 75% de similitud en su secuencia aminoacídica (22). FKBP52 se encuentra codificada por el gen FKBP4; mientras que FKBP51 por el gen FKBP5. FKBP4 y FKBP5 mapean en el cromosoma 12, región p13.33, y cromosoma 6, región p21.31, respectivamente. Han sido identificados ocho pseudogenes para FKBP4, pero ninguno para FKBP5. El gen FKBP4 consiste en 10 exones y 9 intrones que abarcan alrededor de 10- Kb de ADN genómico, mientras que FKBP5 tiene 13 exones y 12 intrones a lo largo de más de 150-Kb [Figura I.2, (23)]. Producto de la transcripción del gen FKBP5, se encuentran cuatro posibles ARN [NM_001145775.2, mensajeros (ARNm) NM_001145776.1, NM_004117.3, NM_001145777.1; (24)], de los cuales, tres de ellos codifican a la misma isoforma de 457 aa [NP_004108.1; (24)]; mientras que uno de los ARNm codifica para una isoforma más corta de 268 aa [NP_001139249.1; (24)].





La isoforma más corta de FKBP51 es producto de una modificación en el extremo 3'UTR que resulta en un corrimiento del marco de lectura del transcripto. Hasta el momento no se han encontrado funciones biológicas asociadas a la isoforma de 268 aa. Por el contrario, se conoce una única isoforma de FKBP52 de 459 aa. [NP_002005.1; (24)]. Estudios sobre la evolución de los genes *FKBP4* y *FKBP5* sugieren que ambos evolucionaron a partir de un gen común ancestral de invertebrados, posiblemente, *fkbp-6* a partir de un evento de duplicación génica ocurrido antes del surgimiento de los peces. Estas afirmaciones tienen en cuenta la presencia de genes ortólogos de *FKBP4* en el *Phyla Chordata*, así como también en *C. elegans* y en *D. melanogaster*; mientras que ortólogos de *FKBP5* se encuentran exclusivamente en *Chordata* (23).

Tanto FKBP51 como FKBP52 humanas se expresan de forma ubicua en tejidos y órganos (25). La expresión de FKBP51 puede ser estimulada por hormonas (26-28). Se ha descubierto que una variante polimórfica de nucleótido único (SNP) en el intrón 2 de *FKBP5* puede generar alteraciones en la expresión de FKBP51 (29). Adicionalmente, la metilación en un sitio de respuesta a glucocorticoides (GRE) encontrado en el exón 7 de *FKBP5*, también modifica la transcripción de este gen (30). Se ha hallado que existe una expresión aumentada de FKB51 en algunos tipos de tumores como melanoma (31) y en líneas celulares tumorales (32), aunque disminuida en cáncer de páncreas (33). Por el contrario, no se conoce demasiado acerca de la expresión constitutiva o inducible de

FKBP52, pero sí está reportado que FKBP52 se encuentra aumentada en células de hepatoma maligno, leucemia de células T y en tumores dependientes de hormona; mientras que se ve disminuida en células normales de mama, testículo y vejiga (34).

Tradicionalmente, FKBP51 y FKBP52 han recibido especial atención ya que fueron las primeras IMMs en ser identificadas como parte de los complejos de receptores de esteroides. Ambas proteínas han sido, junto con la chaperona de choque térmico, Hsp90, y la co-chaperona p23, reconocidas como necesarias para el control de la actividad de todos los receptores de esteroides llamados de "tipo 1": el receptor de andrógenos (AR), receptor de estrógenos (ER), el receptor de glucocorticoides (GR), el receptor de progesterona (PR) y el receptor de mineralocorticoides (MR) (34). FKBP52 es un regulador positivo de GR, PR, AR, pero no así de ER ni de MR (35-40), mientras que FKBP51 es un inhibidor transcripcional de ellos, excepto para el caso de AR, al cual activa. Aun cuando, FKBP51 y FKBP52 comparten 60% de su secuencia aminoacídica y 75% de identidad, y presentan gran semejanza estructural (Figura I.3.a y b), FKBP51 tiene generalmente efecto antagónico a FKBP52 (35).



b.



Figura I.3: Comparación entre los dominios y las estructuras tridimensionales de FKBP51 y FKBP52. Se señalan los dominios de ambas proteínas: Región rica en prolinas, FK1, FK *linker*, FK2, TPR y

extremo C-terminal. **a.** Esquema de la distribución de los diferentes dominios de FKBP51 (arriba) y FKBP52 (abajo) en la secuencia aminoacídica. **b**. Estructura cristalográfica de FKBP51 (izquierda) y FKBP52 (derecha) con representaciones que muestran la estructura secundaria y la superficie molecular. Imágenes reproducidas de Erlejman *et. al.* (34) a partir de las estructuras publicadas en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB). La estructura de FKBP51 corresponde al registro PDBID: 1KT0, mientras que para FKBP52 se superpusieron dos fragmentos estructurales (PDBID: 1Q1C y 1P5Q).

El modelo de activación de los receptores de esteroides

Los receptores de esteroides (RE) pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares. Los RE son factores de transcripción intracelulares que responden a hormonas esteroideas y regulan la transcripción de genes involucrados en la reproducción, la respuesta a estrés, el metabolismo energético y la homeostasis. Las hormonas esteroideas son ligandos de los receptores nucleares capaces de atravesar la membrana plasmática. Si bien la localización primaria de los RE depende del receptor en cuestión y del tipo celular, en todos los casos, los RE migran continuamente entre el núcleo y el citoplasma (41), pero su acción genómica como factores de transcripción, requiere su posicionamiento sobre secuencias promotoras HRE en el ADN.

Los RE forman heterocomplejos con Hsp90, Hsp70 y co-chaperonas. El modelo general de activación de los RE cuenta con varios pasos que modifican la composición y la conformación de las proteínas que integran el heterocomplejo. En particular, nuestro laboratorio ha tenido una participación relevante en la elucidación de los eventos que llevan a la activación y la transformación del heterocomplejo de GR (42). Según el modelo que hemos elucido, GR se encuentra inicialmente como un complejo con Hsp70 y Hsp40. En un segundo paso, la acción ATPasa de Hps70 favorece la entrada de un dímero de Hsp90 y de la proteína organizadora Hop. La maquinaria compuesta por (Hsp90)₂•Hop•Hsp70•Hsp40 transforma al dominio de unión a ligando (LBD) de GR (43). El dominio LBD modifica su conformación cerrada e inaccesible para la hormona a un bolsillo abierto que permite la interacción con su ligando (44). La apertura del bolsillo requiere una serie de sucesos adicionales: un cambio conformacional de Hsp90 a su forma activa unida a ATP, la salida de Hop del heterocomplejo, y la interacción con p23 que estabiliza esta nueva composición. En ensayos in vitro, la función de p23 puede ser reemplazada por la unión de molibdato. La ausencia de Hop permite la unión de una inmunofilina en el sitio aceptor de TPR de Hsp90 (41). En este punto, el oligómero se encuentra en su conformación madura, y es receptivo a la unión de la hormona correspondiente.

Entre las IMMs con dominios TPR que interactúan con el sitio aceptor de Hsp90 y forman parte del heterocomplejo con RE, se cuenta a FKBP51, FKBP52, Cyp40 y las proteínas con dominios FKBP sin actividad PPIasa (FKBP-like) como PP5, XAP2/AIP y FKBPL/WisP39 (34, 41). Las IMMs tienen la capacidad de unirse vía sus dominios TPR al sitio EEVD C-terminal de Hsp90. A pesar de que tanto FKBP51 como FKBP52 pueden interactuar con el complejo maduro de los RE, ambas tienen efectos contrapuestos sobre la activación de los receptores. Como se comentó previamente, en general FKBP52 estimula la acción de los RE mientras que FKBP51 la reduce (excepto de AR). Se ha demostrado que existe un intercambio de FKBP51 por FKBP52 luego de la activación con hormona estimulante de GR, dexametasona, o de MR, aldosterona, por ensayos de inmuno-precipitación (40, 45). La razón principal de la regulación diferencial entre ambas FKBPs radica en que FKBP52 tiene la capacidad de interactuar con la proteína motora dineína, lo que favorece el retrotransporte activo de los heterocomplejos al núcleo a lo largo de la red de microtúbulos. Por otro lado, FKBP51 es incapaz de unir dineína (36). La evidencia experimental indica que FKBP52 interactúa con dineína a través de su dominio PPIasa (46). La Figura I.4 esquematiza el intercambio de FKBP51 por FKBP52 luego de la acción de hormona y el consecuente retrotransporte del complejo. Actualmente se encuentra aceptado el modelo de activación de los receptores de esteroides, en el cual el heterocomplejo de chaperonas atraviesa el poro nuclear junto al receptor y recién se disocia en el núcleo. En este proceso, el complejo de chaperonas interactúa de forma directa con la proteína integral del poro Nup62, con las nucleoporinas citoplasmáticas, y con la proteína de importación nuclear, β -importina (47).



Figura I.4: Modelo de activación del heterocomplejo maduro de GR, Hsp90, Hsp70 y co-chaperonas luego del agregado de hormona, y la represión sobre el factor de Transcripción NF-κB. Referencias: H: hormona; 90: Hps90; 70: Hsp70; 51: FKBP51; 52: FKBP52; Dyn: dineína; p65 y p50 subunidades del heterodímero NF-κB.

Una vez en el núcleo, el receptor libre de chaperonas se dimeriza e interactúa con sus secuencias específicas, se reclutan co-activadores, co-factores y los complejos Swi/Snf remodeladores de la cromatina en las regiones promotoras con secuencias HRE, necesarios para la regulación en le expresión de genes blanco de GR. La permanencia del receptor sobre el ADN depende de una combinación de la acción de proteínas chaperonas, IMMs con dominios TPR y de la acción de la maquinaria proteasomal (48). La degradación proteasomal de GR modula no solamente su biodisponibilidad, sino también su movilidad intranuclear según ensayos de FRAP realizados con inhibidores proteasomales (48, 49). Una de las E3 ligasa para GR es una proteína TPR citoplasmática, CHIP (Carboxyl terminus of Hsc-70 interacting protein). CHIP se une por medio de su dominio TPR al extremo C-terminal de Hsp70 y Hsp90, y posee un dominio U-box que interactúa con la enzima E2 conjugante de ubiquitina. CHIP compite con otras proteínas TPR por el dominio aceptor de Hsp90 y Hsp70. Es posible que esta ubiquitina E3 ligasa sea responsable de regular la degradación de GR (41). Ensayos de FRAP en núcleos aislados han demostrado que la movilidad de la fracción inmóvil de GR por unión al ADN se ve incrementada por la incubación con una mezcla de FKBP51, Hsp90, p23 y CHIP purificadas (50). Se demostró además por incubación con ATP y geldanamicina, un inhibidor específico de la actividad ATPasa de Hsp90 (50), que hay dependencia de la movilidad intranuclear de GR con la actividad ATPasa de Hsp90

En la Figura I.2 se mostraron previamente los dominios estructurales y funcionales de FKBP51 y FKBP52, así como su estructura tridimensional. En líneas generales, estas proteínas pertenecientes a la familia de las FKBPs cuentan con el dominio con actividad PPIasa característico de la familia (FK1), un dominio similar al anterior, pero sin actividad enzimática (FK2) y una serie de repeticiones de dominios TPR. A continuación, se aborda el estudio de FKBP51 y FKBP52 haciendo énfasis en los hallazgos más relevantes y en la importancia funcional de los diferentes motivos presentes en su secuencia aminoacídica.

Los dominios TPR de FKBP51 y FKBP52

Los dominios TPR están compuestos por repeticiones en serie de 34 aa. que forman α hélices anfipáticas antiparalelas, apiladas unas sobre otras y en un ángulo de 24°. La sucesión de dominios TPR permite la interacción con las *Heat shock proteins* o Hsps. Las chaperonas Hsp70 (isoformas Hsc70 y Hsp72) y Hsp90 (isoformas Hsp90α y Hsp90β) usualmente interactúan con dominios TPR de co-chaperonas vía los motivos EEVD conservados del extremo C-terminal de Hsp90. Las Hsps, las co-chaperonas con dominios TPR y las proteínas-cliente, forman complejos multiproteicos que regulan numerosas funciones biológicas. Las IMMs de las familias CyPs y FKBPs son proteínas TPR asociadas a Hsp90.

Ensayos *in vitro* con péptidos fluorescentes correspondientes a la región Cterminal de Hsp70 o Hsp90 conteniendo el motivo EEVD y 6 aminoácidos adicionales, determinaron afinidades diferenciales en la interacción de proteínas TPR con Hsps. Los resultados sugieren que FKBP51 y FKBP52 tienen la capacidad de interactuar tanto con Hsp90 como con Hsp70, pero con una afinidad preferencial de las FKBPs por Hsp90α (51). En la Tabla I.1 se presentan las constantes de afinidad reportadas para cada interacción (51).

Proteína TPR	Constante afinidad (µM)			
	Hsp90a	Hsp90β	Hps70	Hsp70
			citoplasmática	citoplasmática
			inducible	constitutiva
			(Hsp72)	(Hsc70)
FKBP51	$1,24 \pm 0,08$	$2,05 \pm 0,12$	> 100	> 100
FKBP52	1,61 ± 0,36	$1,02 \pm 0,12$	> 75	> 75

Tabla I.1: Constantes de afinidad reportadas en Assimon, *et. al.*(51) para las interacciones evaluadas *in vitro* de FKBP51 y FKBP52 con proteínas Hsp (péptidos de la región C-terminal con el motivo EEVD).

Estudios realizados con mutantes de FKBP51 y FKBP52 han permitido demostrar que la interacción entre estas FKBPs y Hsp90 no depende exclusivamente de sus dominios TPR, sino también de una región adicional de 60 aminoácidos en el extremo C-terminal. Por otro lado, mutantes puntuales en el dominio TPR de FKBP51 y de FKBP52 han visto impedida su interacción con Hps90 (52).

Una mutante puntual de FKBP52 en el dominio TPR, FKBP52 K354A, muestra una disminución en la unión con Hsp90, y una consecuente disminución en la actividad de los RE: AR, GR y PR (34, 52). De forma análoga, una mutante puntual de FKBP51, FKBP51 K352A, también exhibe disminución en la interacción con Hsp90. Los dominios TPR se encuentran altamente conservados, al punto que los dominios TPR de FKBP51 y FKBP52 son intercambiables para su funcionalidad biológica sobre los RE, según ensayos con proteínas quiméricas (37).

El dominio FK1 de FKBP51 y FKBP52

El dominio FK1 es un dominio altamente conservado dentro de la familia de las FKBPs. Tanto el dominio FK1 de FKBP51 como el de FKBP52 presentan una región catalítica con actividad PPIasa.

El dominio FK1 de FKBP52 es esencial para la interacción de esta inmunofilina con la proteína motora dineína, y en consecuencia, también para el transporte retrógrado de los RE (46, 53). Ha sido ampliamente debatido si la actividad PPIasa del dominio FK1 es esencial para el efecto biológico de FKBP52 sobre la regulación de la activación de los RE. El tratamiento con la droga FK506 mostró en un principio una mayor acumulación de GR en el núcleo y un incremento en la transcripción de genes-blanco (54), pero luego

Introducción

se evidenció que ello era en realidad debido a una mayor biodisponibilidad del esteroide por interacción del macrólido con la glicoproteína-p (P-gp) (55). Además de esto, FK506 es una molécula de considerable tamaño que no interactúa exclusivamente con el bolsillo catalítico de las FKBPs, sino que un área importante del macrólido se excluye del surco con actividad enzimática (56). Los primeros ensayos realizados con una doble mutante puntual de FKBP52 sin actividad PPIasa, FKBP52 FD67DV, sugirieron que la actividad enzimática es necesaria para la potenciación de la acción de GR, y parcialmente, también de AR (57). Por otra parte, se sabe que la mutación en F67 y en A68 es potencialmente disruptiva de la conformación del dominio y de la superficie de interacción. Se observó que mutantes puntuales de FKBP52 en F67Y, W90L y F130Y, todas ellas sin actividad enzimática, no mostraron influencia en la acción de GR ni de AR (56). En conclusión, hasta la actualidad, no ha sido demostrado que la actividad PPIasa de FKBP52 sea relevante en su acción biológica sobre las vías de señalización en las que se ha encontrado que participa.

Existe una alta similitud entre los dominios FK1 de FKBP51 y FKBP52. A pesar de ello, ensayos con proteínas-quimera en los que se intercambiaron los dominios han probado que es el dominio con actividad PPIasa el responsable de la acción opuesta de FKBP51 y FKBP52 sobre los RE (56). Es importante remarcar que hay una región rica en prolinas en el dominio FK1 que comprende los residuos 116 a 124, tanto en FKBP51 como en FKBP52, y que mutaciones en esta región han resultado críticas en la acción biológica de los RE (48).

Como ya se comentó, el dominio FK1 de ambas IMMs une drogas inmunosupresoras de origen natural tales como FK506 (Tacrolimus o Fujimicina) y rapamicina (Sirolimus)(ver Figura I.5). Tal interacción inhibe la actividad de PPIasa. La información disponible en las fuentes bibliográficas para las constantes de inhibición fue recopilada en la Tabla I.2. Existen grandes similitudes estructurales y de secuencia entre los sitios activos de las diferentes PPIasas, haciendo difícil la tarea de generar inhibidores específicos que puedan discriminar entre parálogos.



FK506

Rapamicina

Figura I.5. Estructuras de FK506 y rapamicina.

Tabla I.2: Inhibición de la actividad PPlasa por FK506 y rapamicina.						
FKBP	Constante inhibición con FK506	Constante	inhibición	con		
	(K ^{i FK506})	Rapamicina (K _i ^{Rap})				
FKBP12	0,5 nMª	0,5 nM ^b				
FKBP12.6	0,55 nMª	-				
FKBP51	10 -15 nMª (<i>Mus musculus</i>)	3,7 nM ^b				
FKBP52	10 nM ^a	4,2 nM⁵				

Constantes de inhibición de FK506 y rapamicina sobre proteínas FKBPs. Referencias: ^a Fuente: Fanghänel y Fischer (3). ^b Fuente: Dunyak y Gestwicki (1).

Como se muestra en la Tabla I.2, los inhibidores conocidos frecuentemente se unen a múltiples miembros de la familia. Se han realizado esfuerzos para generar nuevos inhibidores basados en la estructura de FK506, con moderado éxito en su capacidad inhibitoria de la actividad PPIasa y de su selectividad. También ha sido evaluada la posibilidad de utilizar derivados de cicloheximida, conocida a partir de su capacidad inhibitoria de la síntesis proteica, por presentar módica inhibición de la actividad PPIasa de FKBP12 (Ki \cong 3,4 µM) (1).

El dominio FK2 de FKBP51 y FKBP52

El dominio FK2 tiene cierta similitud con el dominio FK1, pero carece de actividad enzimática. Tampoco es funcional en su capacidad de reconocer a dineína (53), lo que es privativo del dominio FK1. El bolsillo catalítico no conserva la secuencia de la proteína arquetípica, FKBP12, y muestra una inserción de tres aminoácidos en el mismo [D195, H196 y D197; (58)]. Una FKBP51 mutante con una triple deleción de D195, H196 y D197, genera un defecto en la formación de los complejos con PR, pero no así la interacción con Hsp90. Esta evidencia sugiere que el dominio FK2 tendría un rol en la interacción con el RE (58).

La región **FK linker** conecta los dominios FK1 y FK2. Es de 10 aa. en FKBP52, y 8 aa. en FKBP51, desestructurada y accesible a solvente. En FKBP52 presenta además la secuencia consenso TEEED que es fosforilable por proteína quinasa CKII (34).

Desde el descubrimiento de las proteínas FKBP, han surgido nuevos hallazgos que muestran que las FKBP participan en otros procesos celulares y vías de señalización, además de la activación de los RE. En particular, para FKBP51 y FKBP52, se ha encontrado un rol predominante tanto en sistema nervioso como en el desarrollo del cáncer.

Rol de FKBP51 y FKBP52 en la neurodiferenciación y en enfermedades del sistema nervioso

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la exposición de células indiferenciadas de estirpe neuronal (línea N2a de neuroblastoma y células embrionarias hipocampales murinas) a FK506 favorece su diferenciación a neuronas. Este efecto se ve exacerbado por la sobreexpresión de FKBP52 e inhibido por la sobreexpresión de FKBP51, mientras que el silenciamiento de FKBP51 favorece la diferenciación neuronal y el silenciamiento de FKBP52 lo desfavorece (59). También se ha demostrado que FKBP51 estabiliza microtúbulos y favorece la asociación de Tau (*Microtuble asociated protein tau*) con Hsp90 en forma PPIasa-dependiente. La proteína Tau se expresa en células neuronales y cumple un rol en la estabilización del citoesqueleto neuronal. La actividad PPIasa de FKBP51 isomeriza enlaces peptídicos precedentes a una prolina presentes en Tau a una configuración *cis.* FKBP51 estabiliza a la proteína Tau y favorece su desfosforilación, con un posible rol en el desarrollo de desórdenes que involucran el plegado y acumulación de proteínas, tal como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (35).

Recientemente, ha cobrado importancia el estudio de FKBP51 en desórdenes psiquiátricos. Una variante del gen *FKBP5* en humanos en una región promotora de *FKBP5* ubicada en el intrón 2, ha sido detectada como una de las causas de predisposición a numerosas psicopatologías, entre las que se encuentran desórdenes de estrés postraumático y depresión. El polimorfismo en rs1360780 presenta dos alelos con diferencias en un único nucleótido (SNP), i.e. el alelo T que está considerado de riesgo para enfermedades psiquiátricas, y el alelo C que resultaría protector. El alelo T permite la interacción de GR con la secuencia GRE del promotor del intrón 2, y como consecuencia, desencadena una mayor expresión de FKBP51. Por otro lado, en el alelo

C el sitio GRE de respuesta a glucocorticoides se encuentra inactivo. El modelo vigente, involucra también un segundo sitio de respuesta GRE ubicado en el intrón 7 del gen *FKBP5*. Este sitio puede ser modificado epigenéticamente con un efecto estimulante sobre la expresión de FKBP51. Frente a una situación traumática, la hipótesis propuesta sugiere que se produce un aumento en la síntesis de cortisol y la metilación del sitio GRE del exón 7. Como consecuencia del cambio epigenético, se generaría un aumento en la expresión de FKBP51 en hipotálamo. En personas sin predisposición genética, la síntesis de cortisol eventualmente merma, volviendo a la situación normal. En individuos con el alelo T, hay un aumento mayor en la síntesis de FKBP51 en hipotálamo respecto a personas con el alelo C, lo cual desfavorece la retroalimentación negativa del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal involucrado en la síntesis de cortisol. La alteración en la síntesis de hormona provoca una liberación anormal y prolongada de cortisol. Niveles elevados de cortisol son en parte responsables de los problemas psiquiátricos que predominan en pacientes con el alelo de riesgo (29, 30).

FKBP52 tiene un rol antagónico a FKBP51 en lo que respecta a la diferenciación neuronal. La sobreexpresión de FKBP52 induce la diferenciación neuronal y el alargamiento de neuritas en células N2a indiferenciadas (59). FKBP52 forma un complejo perinuclear con Hsp90 y p23 en células de hipocampo y neuroblastoma indiferenciadas. El tratamiento con FK506 induce la neurodiferenciación y favorece el transporte de FKBP52 de la zona perinuclear hacia las terminales axónicas y las áreas de arborización (34, 59). FKBP12 no sería responsable del efecto neurotrófico de FK506, ya que resultados similares se obtuvieron en células KO para FKBP12 (34). Estudios bioquímicos han recuperado a FKBP52 asociada a microtúbulos. Además de la conocida interacción de FKBP52 con dineína, se ha reportado la interacción con la proteína Tau. FKBP52 interactuaría predominantemente con Tau fosforilada. Asimismo, la sobreexpresión de FKBP52 podría prevenir la acumulación de Tau e inhibiría la polimerización de tubulina (34).

La importancia de FKBP51 y FKBP52 en cáncer.

Una de las primeras evidencias que relacionan a FKBP51 con patologías malignas fue la observación de que FKBP51 se encuentra sobreexpresada en desórdenes mieloproliferativos crónicos, ciertos linfomas, gliomas, melanoma y cáncer de próstata; así como también en numerosas líneas celulares tumorales como T47D y MCF7 de cáncer de mama, Hela, Caco-2, U2OS y HepG2 (32). Estudios realizados en nuestro laboratorio en colaboración con la Dra. Elisa Bal (Instituto Roffo, Buenos Aires) revelaron que FKBP51 se encuentra sobreexpresada y activada en 25 tipos diferentes de tumores humanos (tesis doctoral de la Dra. Luciana Gallo). En correspondencia con estos hallazgos, ha sido determinado que en melanoma la expresión de FKBP51 se encuentra incrementada, y el silenciamiento de esta IMM disminuye la resistencia a irradiación y tratamientos quimioterapéuticos (31, 60). En contraposición, la expresión de FKBP51 se encuentra disminuida en casos de cáncer de páncreas (61) y en algunos tipos particulares de cáncer de mama.

En cáncer de páncreas se ha descubierto, que FKBP51 regula negativamente la proteína quinasa AKT en un mecanismo dependiente de la fosfatasa PHLPP. AKT es activada por varios factores de crecimiento en una señalización que involucra a la quinasa PI3K, y tiene un efecto positivo sobre la supervivencia celular. La fosforilación de ATK en Ser473 es necesaria para su activación. FKBP51 interactúa con PHLPP y favorece la desfosforilación de AKT. Como consecuencia de la expresión disminuida de FKBP51 en células derivadas de cáncer de páncreas, la vía de AKT se encuentra activada. Se ha demostrado que la sobreexpresión de FKBP51 exógena en células de cáncer de páncreas favorece la muerte celular inducida por drogas quimioterapéuticas. Los niveles reducidos de FKBP51 en cáncer de páncreas serían responsables de la resistencia de este tipo de tumores a los tratamientos convencionales con quimioterapia (33, 62, 63).

Contrariamente a lo observado en cáncer de páncreas, la sobreexpresión de FKBP51 ha resultado en una disminución de la muerte celular frente a estrés oxidativo en células Hek293T y 3T3L1 (32, 64). Posiblemente, la sobreexpresión de FKBP51 en ciertos tipos de tumores podría tener un efecto antiapoptótico. Estudios de sobreexpresión y *knock-down* de FKBP51 sugieren que tal efecto podría deberse en parte a la estabilización del potencial de la membrana mitocondrial, lo que desfavorece la exportación mitocondrial de citocromo c y la subsecuente activación de caspasas (65), aunque no pueden descartarse mecanismos nucleares que resultan de la traslocación de FKBP51 al compartimiento nuclear. Las diferentes evidencias sugieren que tanto el efecto de FKBP51 como oncogén o como gen supresor de tumores, sería dependiente del tipo celular involucrado.

Como ya se comentó, FKBP52 está sobreexpresada en hepatomas malignos, leucemias de células T y tumores dependientes de hormona. Asimismo, FKBP52 se encuentra altamente expresado en líneas tumorales de cáncer de mama, tanto en tejido pre-invasivo como en células tumorales (34). Evidencias más recientes demostraron que FKBP52 se asocia con el desarrollo de glioblastoma multiforme, el tumor primario más agresivo conocido del sistema nervioso central. El mecanismo propuesto sugiere que FKBP52 regula el metabolismo de triptófano a través de la enzima Triptofano- 2,3deshidrogenasa (TDO) (61). También se ha reportado recientemente que niveles elevados de FKBP52 se correlacionan con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama (66); y una mayor expresión de FKBP52 se correlaciona con la proliferación de células ER- α positivas (67).

AR tiene un rol preponderante en la proliferación de células de cáncer de próstata, tanto en tumores dependientes de hormona como en tumores resistentes a castración. FKBP52 es un regulador positivo de la acción de AR, y en este sentido se ha demostrado que el derivado MJC13 específicamente interactúa con AR en la superficie de unión a FKBP52. MJC3 inhibe la función de FKBP52 sobre la traslocación de AR al núcleo en células de cáncer de próstata, así como la proliferación de células tumorales de próstata inducida por hormona (68).

El factor de transcripción p53 posee una función pro-apoptótica que puede inducir arresto celular y es un conocido gen supresor tumoral. Cerca del 50% de los cánceres humanos muestran una mutación en el gen p53 que involucra la pérdida de su función (69). Experimentos de nuestro laboratorio demostraron que mutantes citoplasmáticas de p53 (las que se asocian a Hsp90) también interactúan con FKBP52 vía los dominios TPR de Hsp90, así como con dineína, y que al igual que en el caso de los receptores de esteroides, FKBP52 es esencial para que el heterocomplejo de p53 transloque al núcleo (70).

Dado que el laboratorio contribuyó de forma central al esclarecimiento del modelo de activación y retrotransporte de los RE mediado por Hsps y FKBPs, esto llevó a plantear la hipótesis de que la activación de otros factores de transcripción que deban sufrir una translocación subcelular equivalente podrían llegar a utilizar la misma maquinaria molecular. En el año 2004, Galigniana *et. al*, ya habían demostrado que el factor de transcripción p53 interactuaba con FKBP52 y dineína, y que transloca al núcleo en forma dependiente de la interacción con FKBP52, luego del estímulo correspondiente (70). Existen otros factores de transcripción, además de los RE y de p53, que se encuentran inactivos en el citoplasma, y migran al núcleo luego de ser inducidos por agentes externos. Estos factores, podrían ser entonces candidatos para evaluar si su
pasaje del citoplasma al núcleo involucra la formación de un complejo con FKBP51, FKBP52 y Hsps de forma análoga a los RE.

Entre los factores de transcripción que se encuentran retenidos en el citoplasma en ausencia de estímulo y migran al núcleo luego de su activación, se encuentran entre otros NF- κ B, AP-1, proteínas Stat, HSF1, NFAT, Nrf2, etc. Adicionalmente, algunos de estos factores interactúan además con el coactivador de RE, RAC3 (71-74), mientras que otros tienen estrecha relación con algunos RE. En el caso de NF- κ B, GR regula negativamente la transcripción dependiente de NF- κ B por un mecanismo de transrepresión, el cual es responsable de la acción antiinflamatoria de glucocorticoides (75). Se ha reportado además que NF- κ B es transportado al núcleo por el complejo motor dineína/dinactina. (76).

El factor de transcripción NF-κB

NF-κB es un factor de transcripción dimérico formado por miembros de la familia de proteínas Rel, la cual está altamente conservada a lo largo de la evolución. Cumple un rol crítico en la regulación de múltiples procesos biológicos tales como inflamación, inmunidad, proliferación celular, apoptosis, diferenciación, desarrollo y supervivencia (77), siendo a menudo sus múltiples acciones pleiotrópicas contrapuestas según el tipo de tejido en cuestión.

La familia de factores de transcripción NF-kB

En mamíferos, la familia del factor transcripcional NF- κ B está conformada por cinco miembros: Rel A/p65, RelB, c-Rel, p50-p105/NF- κ B1 y p52-p100/NF- κ B2 (78). Estas proteínas forman homodímeros o heterodímeros con diferente composición. En general, puede haber múltiples combinaciones de proteínas Rel para dar lugar a un factor de transcripción dimérico funcional, tal como se esquematiza en la Figura I.6. Los complejos resultantes presentan diferente especificidad de unión al ADN y funciones celulares diversas. A pesar de que existen alrededor de 15 dímeros posibles (Figura I.6), la significancia biológica de todos ellos no ha sido demostrada (77). El heterodímero p50•p65 es el más abundante y es encontrado en prácticamente todos los tipos celulares, al punto que se ha transformado en sinónimo de NF- κ B.

El proto-oncogén c-Rel es una proteína que en humanos es codificada por el gen *REL*. Los miembros de la familia del factor transcripcional NF-κB poseen todos ellos un dominio altamente homólogo al de c-Rel, el *Rel homology Domain* (RHD), el que comprende alrededor de 300 aminoácidos, con alrededor del 50% de identidad entre las diferentes miembros de la familia NF- κ B (79). Este dominio RHD es el que interactúa directamente con las secuencias de ADN blanco. A su vez, la familia de proteínas NF- κ B puede ser subdividida en dos grupos según cuenten con un dominio adicional de transactivación (TAD), o bien éste se encuentre ausente. Es así que p65, RelB y c-Rel presentan un dominio TAD en su extremo C-terminal, mientras que p50 y p52, no. RelB, además requiere de un dominio N-terminal de cierre de leucinas.

Los factores de transcripción activos p50 y p52 resultan de la proteólisis de los precursores p100 y p105, respectivamente. Durante el procesamiento de p100 y p105, se pierde la región C-terminal que presenta dominios ankirina con efecto inhibitorio (Figura I.7). Los dominios repetitivos de tipo ankirina también se encuentran presentes en las proteínas inhibitorias de NF- κ B, *inhibitor of NF-\kappaB* (I κ B), por lo que p100 y p105 podrían ser consideradas también como proteínas IkB. Las proteínas precursoras, p100 y p105, pueden inhibir la localización nuclear y la actividad transcripcional de los dímeros de NF-kB de forma análoga a como lo hacen las proteínas IkB. A su vez, p100 y p105 interactúan con otras proteínas de la familia NF-κB a través del dominio RHD, mientras que los dominios C-terminales de repeticiones de ankirina cumplen una función inhibitoria sobre el factor de transcripción (77). Ambas son procesadas de forma dependiente de una señal Glycin Rich Region (GRR) localizada en el C-terminal del dominio RHD. El procesamiento de p100 ocurría constitutivamente, obteniéndose como resultado una mezcla de dímeros conteniendo tanto las subunidades p105 como p50 de NF-κB. Por el contrario, p100 es procesada de forma inducible por estímulos activadores de la vía de señalización no canónica de NF-kB. Adicionalmente, esta proteína de la familia Rel, puede ser degradada en forma parcial para dar lugar a p52, o bien degradarse en forma total.



Figura I.6. Proteínas NF-κB. a. Esquema que muestra los posibles dímeros de NF-κB. Modificado de Vincent, *et.al.* (80). **b.** Distribución de dominios en los miembros de la familia RelA que forman parte de NF-κB. Modificado de Oeckinghaus *et. al.* (77). Referencias: RHD: *Rel Homology Domain,* TAD: *Transactivation domain,* LZ: Cierre de leucinas o *Leucine Zipper,* GRR: *Glycin Rich Region,* ANK: repeticiones de ankirina, DD: *Death Domain.*

Las proteínas IkB

Todas las proteínas I κ B se caracterizan por la presencia de siete repeticiones de ankirina que interactúan con el dominio RHD de proteínas NF- κ B. I κ B secuestra a los dímeros de NF- κ B en el citoplasma, previniendo su unión al ADN y actividad transcripcional. Cada proteína I κ B se asocia preferentemente a un grupo particular de dímeros de NF- κ B. En este sentido, I κ B α inhibe preferencialmente los complejos p65•p50.



Figura I.7. Proteínas I κ **B.** Esquema de los dominios funcionales de las proteínas I κ B α , β y ϵ . Modificado de Oeckinghaus *et. al.* (77). Referencias: ANK: ankirina, PEST: región rica en aminoácidos Pro, Glu, Ser, Tre.

La interacción de NF- κ B con alguna de las proteínas I κ B prototípicas I $\kappa\alpha$, I $\kappa\beta$ e I κ B ϵ , y con los precursores p105 y p100 determinan la localización citoplasmática del factor de transcripción en células en reposo. En la vía de activación canónica, en ausencia de estímulo activador, I κ B α enmascara la secuencia de localización nuclear (NLS) sobre p65 y aporta una secuencia de exportación nuclear (NES) presente en I κ B α . La NLS de p50 permanece descubierta, aunque en presencia de I κ B α unido a p65, para el heterodímero p65•p50, el equilibrio de transporte anterógrado y retrógrado se favorece hacia la permanencia citoplasmática del factor (77). Los residuos Ser32 y Ser36 de I κ B α son blanco de fosforilación por el complejo de quinasas IKK. Luego, las proteínas I κ B son modificadas por ubiquitina E3 ligasas de la familia SCRF, y marcadas para su degradación vía proteasoma. La degradación de I κ B α cambia el estado de equilibrio, favoreciendo la presencia nuclear de p65•p50. I κ B α también participa de un mecanismo de retroalimentación negativa, ya que la expresión de I κ B α se encuentra estimulada por la activación de NF- κ B.

Otras proteínas I κ B canónicas tienen funciones más diversas. I κ B β tiene similar preferencia por la unión a dímeros de NF- κ B, aunque puede interactuar con estos complejos unidos a ADN, sugiriendo una posible regulación negativa sobre la transcripción.

El complejo de quinasas IKK

El complejo de quinasas IKK cuenta con dos quinasas catalíticamente activas, IKK α e IKK β , así como también de la subunidad regulatoria IKK γ o NEMO. La Figura I.8 muestra a las proteínas que forman el complejo IKK con sus respectivos dominios funcionales. IKK α e IKK β poseen un dominio quinasa en el extremo N-terminal, un dominio cierre de leucinas (LZ), un *Helix Loop Helix* (HLH, y un dominio C-terminal *NEMO Binding Domain* (NBD). El dominio LZ es responsable de la dimerización de ambas proteínas, mientras que el dominio HLH es necesario para la actividad quinasa. El dominio NBD consiste en una secuencia de seis aminoácidos que, como su nombre lo indica, median la interacción de IKK α/β con la subunidad regulatoria NEMO. La activación del complejo de quinasas IKK depende de la fosforilación de al menos una de sus subunidades catalíticas, IKK α o IKK β en dos residuos Serina del dominio HLH. Ambas quinasas se expresan de forma ubicua, y la fosforilación de IKK α o IKK β depende del estímulo activador de NF- κ B.



Figura I.8. Proteínas del complejo IKK. Esquema de los dominios funcionales de las proteínas ΙκΒα, β y ε. Modificado de Oeckinghaus *et. al.* (77). Referencias: ANK: ankirina, PEST: región rica en aminoácidos Pro, Glu, Ser, Tre.

La vía de activación canónica de NF- κ B es inducida por una variedad de agentes inflamatorios, citoquinas, moléculas asociadas a patógenos y receptores antigénicos, en la que ocurre la fosforilación de IKK β . Tanto IKK β como NEMO resultan esenciales para que ocurra la fosforilación de I κ B α , y como consecuencia, la degradación del inhibidor y el retrotransporte de NF- κ B al núcleo. Por el contrario, la vía de activación no canónica es activada a través de una cantidad reducida de receptores que incluyen a: BAFFR, CD40, LT β R, RANK, TNRF2 y Fn14 (81). Más aún, la señalización no canónica de NF- κ B depende de la actividad de IKK α , y no así de IKK β ni de NEMO. IKK α fosforila a la proteína precursora p100 que forma parte del complejo p100•RelB. Esto resulta en la degradación parcial de p100 por el proteasoma, dando lugar al dímero p52•RelB. El dímero es liberado para su translocación nuclear y la interacción con secuencias promotoras de respuesta a NF- κ B.

La vía canónica de señalización de NF-κB

La vía canónica de activación de NF- κ B puede ser estimulada por señales proinflamatorias tales como citoquinas, entre las que se encuentran TNF- α , IL-1 e IL-6, moléculas asociadas a patógenos (PAMPs) y otras moléculas asociadas al daño celular (DAMPs). En lo que respecta a esta vía de activación de NF- κ B, existen diferentes caminos que llevan a la activación del complejo de quinasas IKK, dependiendo del receptor de membrana involucrado y de las proteínas implicadas río abajo del receptor.

La activación del receptor *Tumor Necrosis Factor Receptor 1* (TNFR 1) recluta a proteínas adaptadoras *TNFR1 Associated Death Domain* (TRADD) y *TNF receptor-associated factors 2/5* (TRAF2/5) (82). Como consecuencia, ocurre un segundo reclutamiento que consiste en la llegada de un complejo de Ubiquitin E2/E3 ligasas que

contiene a UbcH5 y cIAP1. Estas Ubiquitin E2/E3-ligasas conjugan cadenas lineales de ubiquitina sobre la quinasa *Serine/threonine kinase receptor-interacting protein 1 (*RIP1). Las cadenas de ubiquitina posibilitan la interacción entre TAB/TAK1 y el complejo de quinasas IKK. TAK1 finalmente es la encargada de fosforilar y activar a IKK β (80). (Figura I.9 izquierda)

Un segundo mecanismo de activación de IKKβ que involucra a TNFR 1 conlleva el reclutamiento de proteínas adaptadoras TRADD y TRAF2/5, y de cIAP1; pero de un complejo de Ubiquitin ligasas diferente. En esta vía, participa el complejo de Ubiquitinligasas LUBAC, el cual comprende a las proteínas HOIP y TOIL-1L. En consecuencia, el complejo LUBAC conjuga una cadena de ubiquitina en la proteína regulatoria NEMO que resulta en la activación del complejo IKK. La fosforilación de IKKβ es presuntamente consecuencia de un mecanismo de *trans* auto-fosforilación. (Figura I.9 centro).

El tercer mecanismo descripto involucra a los receptores del tipo *Interleukin-1 Receptor* (IL-1R) y *Toll Like Receptors* (TLRs). La activación por sus ligandos específicos recluta a las proteínas MyD88 e IRAK, así como también a un complejo de Ubiquitin E2/E3 ligasas compuesto por TRAF6 y Ubc13. Consecuentemente, ocurre la ubiquitinación de IRAK1, lo cual permite la interacción entre TAK1 y el complejo IKK. Finalmente, TAK1 fosforila y activa a IKKβ. (Figura I.9 derecha).

Uno de los activadores de NF- κ B utilizados en esta tesis es el éster de forbol 12miristato-13-acetato (PMA), un activador de NF- κ B ampliamente utilizado en investigación biomédica. El mecanismo de PMA sobre NF- κ B involucra la activación de la quinasa PKC, la que fosforila a TRAF2 y como consecuencia de ello, ocurre la ubiquitinación de RIP1, y finalmente la activación de IKK β (82, 83). Una vez que IKK es activada, fosforila a I κ B α en dos Ser terminales, Ser32 y Ser36. La fosforilación de I κ B α permite el reclutamiento de la Ubiquitina E3 ligasa SCF/ β , encargada de ubiquinar al inhibidor de NF- κ B y para ser degradado por el proteasoma 26S. La subsecuente ubiquitinación y degradación de I κ B α libera al dímero de NF- κ B para ser transportado al núcleo. Los principales dímeros transcripcionalmente activos de esta vía de señalización son p65•p50, y en menor abundancia, p65•p65, cReI•cReI y cReI•p50 (Figura I.6. A).



Figura I.9. Activación del complejo de quinasas IKK en la vía de señalización canónica de NF-κB. Esquema de las proteínas involucradas en la señalización y las tres vías posibles de activación de IKK (izquierda, centro y derecha). Fuente: Vincent et. al. (80).



Figura I.10. Las diferentes vías de activación de NF-κB.

a. Activación canónica de NF- κ B. Involucra la activación del complejo de quinasas IKK luego de la estimulación del receptor (TLR, TNFR o IL-1R) con LPS, TNF- α o IL-1. IKK β fosforila a I κ B α en dos residuos serina, lo que señaliza para su degradación por el proteasoma. La degradación de I κ B α permite la subsecuente-te translocación del heterodímero p65•P50 al núcleo, y la consecuente regulación de los genes blanco κ B.

b. Señalización no canónica de NF- κ B. Puede ser activada por los receptores CD40, RANK, BAFFR y LT β R con sus respectivos ligandos. La quinasa NIK es activada en esta cascada, provocando la fosforilación de IKK α . IKK α está encargada de fosforilar a la proteína p100, lo que desencadena su degradación parcial por el proteasoma. El

procesamiento de p100 a p52 permite la translocación del heterodímero de NF-κB, RelB•p52, y la regulación de la expresión de sus genes blanco. Esquema integrado modificado de Lagadari *et. al.* (7).

Modificaciones post-traduccionales de NF-ĸB

Además de las modificaciones en $I\kappa B$ y las proteínas quinasa del complejo IKK, las modificaciones post-traduccionales sobre las subunidades de NF- κB son clave para regular su actividad. Las más estudiadas ocurren en la subunidad p65 e incluyen fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinación, entre otras. Se han detectado numerosos sitios de fosforilación de p65, los que se detallan en la Figura I.11.a y la Tabla I.3, en donde también se explicita la quinasa responsable y la función biológica involucrada.



Figura I.11: Modificaciones post-traduccionales de p65. a. Residuos modificados por fosforilación. Modificado de: Christian et. al. (84). **b.** La estabilidad de p65 es regulada por ubiquitinación de p65 en diferentes residuos. Fuente: Collins *et. al.* (85). Referencias: P: fosforilación, Ub: ubiquitinación, I: isomerización. RHD: *Rel Homology Domain*, TAD: *Transactivation domain*

Sitio de fosforilación	Proteínas quinasa	Función Biológica
S205	Desconocido	Transactivación
T254	Desconocido	Activación de isomerización de
		prolina por Pin-1
S276	PKA-C, MSK1, MSK2,	Transactivación y acetilación
	RSK p90, PKC	en K310
S281	Desconocido	transactivación
S311	PKC	Transactivación y acetilación
		en K310
S316	Desconocido	Transactivación
T435	Desconocido	Transactivación
S468	GSK3	Inhibición
	IKK	Transactivación
T505	Chk1	Inhibición
S529	CK2	Transactivación
S536	ΙΚΚα,β y ε, ΝΑΚ/ΤΒΚ1	Transactivación y
	RSK1	estabilización
		Disminuye la exportación
		nuclear medidada por ΙκΒα

 Tabla I.3: Fosforilación de p65 en diferentes residuos.
 Fuente: Hoesel et. al. (86)

 y Christian et. al. (84)

La ubiquitinación de p65 se encuentra íntimamente relacionada con su estabilidad. Además de cadenas de ubiquitina unidas a través de K48 asociadas a la degradación proteasomal, se han encontrado cadenas de ubiquitina no degradativas (K29, K33 y K63) que modifican a p65, aunque no se conocen aún las consecuencias de estas modificaciones sobre esta subunidad. Los diferentes sitios de ubiquitinación de p65 reportados son producto de la acción de diferentes ubiquitina-E3 ligasas, entre las que se encuentran: SOCS1, MKRN, PPAR- γ e ING-4 (87). La ubiquitinación de p65 cumple un rol en el mantenimiento del equilibrio de los niveles de p65, pero también es requerida para la eficiente terminación de la transcripción mediada por NF- κ B. La unión al ADN es un desencadenante de la ubiquitinación de p65, por lo que solo una pequeña fracción de la proteína p65 es degrada, removiéndola de los sitios promotores κ B. La inhibición de la degradación de p65 por inhibidores del proteasoma o con proteínas p65 recombinantes resistentes a la ubiquitinación resulta en una expresión sostenida de algunos genes blanco de NF- κ B específicos (85).

Otro de los mecanismos que contribuyen a la terminación de la transcripción mediada por NF- κ B es la síntesis de I κ B α y su acción nuclear sobre los dímeros de NF- κ B. NF- κ B regula la expresión de su proteína inhibitoria I κ B α , constituyendo uno de los principales mecanismos de regulación negativa. I κ B α sintetizada *de novo* no solo desfavorece la interacción de NF- κ B con ADN, sino que además estimula su exportación nuclear (88).

El rol de NF-kB en cáncer

NF-κB regula la expresión de genes que participan de diferentes procesos celulares como supervivencia, invasión, proliferación, angiogénesis, inflamación y transición epitelio-mesenquimal, involucrados en el desarrollo y promoción del cáncer (Figura I.12). Los genes blanco de NF-κB cumplen funciones capaces de promover un fenotipo oncológico. Se ha identificado un subgrupo de linfomas de célula B grande difusa que requieren de NF-κB para su crecimiento y supervivencia, ya que la expresión de los genes asociados a este tipo de linfoma se ve bloqueada por la inhibición de NF-κB (89). De forma similar, la expresión de la proteína oncogénica Ras regula de forma NF-κB-dependiente a aproximadamente 25 genes. Existen mecanismos comúnmente asociados a todos los tipos de cáncer que involucran: la autosuficiencia de la proliferación, la pérdida de mecanismos inhibitorios del crecimiento, la supresión de

umbrales de apoptosis, el aumento de propiedades angiogénicas y la habilidad de invadir tejido local y hacer metástasis en sitios distantes. NF-κB participa y puede afectar de alguna forma estos mecanismos (78).



Figura I.12. NF-κB regula la expresión de genes involucrados en diferentes procesos celulares que participan en el desarrollo y promoción del cáncer. Modificado de Basseres *et. al.*(78).

Existen mecanismos comúnmente asociados a todos los tipos de cáncer que involucran: la autosuficiencia de la proliferación, la pérdida de mecanismos inhibitorios del crecimiento, la supresión de umbrales de apoptosis, el aumento de propiedades angiogénicas y la habilidad de invadir tejido local y hacer metástasis en sitios distantes. NF-κB participa y puede afectar de alguna forma estos mecanismos (78).

NF- κ B puede promover la proliferación celular a través de la regulación de genes blanco-específicos. Por ejemplo, NF- κ B puede favorecer la hiperfosforilación de Rb por activación del promotor de ciclina D1. IKK α participa en la transcripción del gen de ciclina D1 por medio de la fosforilación del factor de transcripción β -catenina. NF- κ B también se encuentra asociado a la regulación positiva de HIF-1 α .

NF- κ B directamente regula una vía antiapotótica. Genes supresores de la apoptosis, como Bcl-2 y Bcl-xl, que se encuentran frecuentemente sobreexpresados en cáncer humano. La inhibición de NF- κ B en ciertas líneas celulares tumorales resulta en la muerte por apoptosis. Este es el caso de Reed-Sternberg (RS) de linfoma de Hodgkin, dónde la inhibición de NF- κ B provocada por la expresión de I κ B α genera una disminución

en la expresión de A1/BfI-1, BcI-xI y el inhibidor de la apoptosis, c-IAP2, que afecta la proliferación y supervivencia de las células.

Muchos tumores exhiben un aumento de la angiogénesis, un proceso que es requerido para el mantenimiento y la progresión del tumor, y la habilidad de células tumorales de invadir tejido local y hacer metástasis. Estos procesos involucran también un cambio en la expresión de moléculas de adhesión, integrinas y proteasas extracelulares como metaloproteasas. La transición epitelio-mesenquimal constituye una alteración encontrada en frecuentemente en fenotipos metastásicos. NF- κ B tiene un rol en cada uno de estos procesos, ya que ha sido reportado que promueve la angiogénesis y la metástasis de ciertos modelos cáncer. Su acción se asocia principalmente a la regulación del factor de crecimiento endotelial VEGF y a la expresión de metaloproteasas (MMPs). La inhibición de NF- κ B en melanoma y cáncer de ovario resulta en una reducción en la expresión de VEGF y de IL-8, con un efecto antiproliferativo que bloquea la angiogénesis y la metástasis.

Se ha reportado una activación aberrante de NF-κB en varios tipos de cáncer, tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas, los que se resumen en la Figura I.13.



Figura I.13. La activación constitutiva de NF-κB se encuentra en distintos tipos de blastos y tumores primarios humanos. Modificado de: Basseres y Baldwing *et. al.*(78).

Inhibición farmacológica de NF- κ B como acercamiento terapéutico para el tratamiento de cáncer.

La inhibición de NF- κ B tiene efecto potencial sobre la proliferación de células tumorales y sobre enfermedades inflamatorias. Muchos productos naturales con propiedades antitumorales y antiinflamatorias han mostrado la capacidad de inhibir a NF- κ B. P.ej. la wedelolactona, un inhibidor de las quinasas de I κ B es capaz de suprimir la fosforilación de I κ B y de p65 en Ser536 y en Ser468. Otros compuestos naturales como parthenolide, honokiol y magnolol también inhiben la vía de señalización de NF- κ B. Compuestos inhibitorios de la vía PI3K/Akt y que inducen muerte celular presentan un efecto negativo sobre la activación de NF- κ B, por ejemplo, evodiamina, oridonina, alantolactona, isoalantolactona, casticina, ácido B pseudolarico y jaceosidina. Adicionalmente, compuestos antioxidantes como tioles antioxidantes, quelantes de calcio y derivados de vitamina E y C, y del ácido alfa lipoico han sido utilizados como inhibidores de la activación de NF- κ B inducida por peróxido de hidrógeno (90).

Inhibidores del proteasoma, bloquean la degradación de diferentes proteínas ubiquitinadas dentro de la célula, incluyendo a miembros de la familia IkB. Estas drogas también han sido utilizadas en el tratamiento de cáncer con el objeto de bloquear la actividad de NF-kB, como es el caso de leucemia de células T y mieloma múltiple. El inhibidor del proteasoma más frecuentemente utilizado en estos casos es Bortezomib en combinación con un inmunomodulador y un agente quimioterapéutico. La talidomida, un potente inmunomodulador y sus análogos, también son drogas capaces de bloguear la acción de NF-κB a nivel de la actividad de IKK. El tratamiento con estas drogas ha demostrado que poseen acción antitumoral con impacto en la apoptosis y el arresto de proliferación, mieloma múltiple refractario (78). Otros la especialmente en inmunomoduladores como los glucocorticoides, dexametasona, prednisona y metilprednisolona son utilizados por sus propiedades antiinflamatorias. Los glucocorticoides inhiben la vía de activación de NF-kB por un mecanismo de transrepresión al disminuir su unión al ADN (90).

La curcumina, un componente extraído de la especie *Curcuma longa*, comúnmente conocida como cúrcuma, ha sido estudiada extensamente en líneas celulares con un efecto antitumoral y antiangiogénico, y una inhibición en la expresión de genes regulados por NF-κB (Ciclina D1, Bcl-2 y Bcl-xl). Extensivos ensayos clínicos han sido efectuados con curcumina para el tratamiento de enfermedades de origen

inflamatorio, inmunodeficiencias, y cáncer, entre otras, con resultados prometedores (91). De forma similar, inhibidores de IKK, BAY 11-7082 y AS602868, han mostrado cierta eficacia en modelos de leucemia en su habilidad de inducir apoptosis (92, 93).

Un hecho que merece ser destacado es que, además de la regulación en la expresión de genes que regulan la proliferación y supervivencia celular, NF-κB también ejerce acción moduladora sobre una familia de factores de transcripción, la de E2F, los que son importantes reguladores del ciclo celular y la apoptosis.

La familia de factores de transcripción E2F.

La familia de factores de transcripción E2F es determinante en la progresión del ciclo celular, así como también se ha determinado que en ciertas condiciones regula la muerte celular (94). Las proteínas E2F se unen al ADN y regulan la transcripción de diversos genes formando heterodímeros con miembros de la familia de proteínas DP. Las proteínas E2F se clasificaron tradicionalmente en activadores e inhibidores de la transcripción. Dentro de los activadores se encuentran los E2F1–E2F3, y dentro de los represores E2F4-E2F7 (95). E2F4 y E2F5 son malos activadores transcripcionales, y parecen funcionar principalmente como represores (96). No obstante, el campo de la familia E2F presenta al presente más incertidumbres que certezas respecto de su modo de acción, y mucho resta por descubrirse. La función de las E2F se regula finamente por proteínas inhibitorias del tipo *Retinoblastoma Protein Rb* (i.e. pRb, p107 y p130), así como también de cofactores necesarios para su actividad transcripcional, tales como histona-acetil-transferasas (HATs) (97). Los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3 interactúan exclusivamente con pRB, E2F4 puede interactuar con las tres proteínas Rb, mientras que E2F5 une exclusivamente p130 (96).

El mecanismo por el cual ocurre la activación transcripción dependiente de E2F requiere de la interacción con HATs, mientras que se cree que Rb recluta remodeladores de cromatina con actividad de histona desacetilasa (HDAC), metil-transferasa de histonas, metiltransferasa de ADN y remodeladores dependientes de ATP. En condiciones de privación de suero, los miembros represores de la transcripción junto a sus proteínas Rb se posicionan sobre los promotores regulados por E2F impidiendo su transcripción. Luego de la entrada a G1, estos promotores son liberados, y los sitios se ocupan por E2F activadores que promueven la transcripción de estos genes (98, 99). El proceso descripto es consecuencia principalmente de la fosforilación de proteínas Rb en G1 por Cdks: Ciclina D/ckd4,6 y Ciclina E/cdk2 (96). En líneas generales el mecanismo

anterior fue el descripto para la regulación de genes por E2F; sin embargo, evidencias recientes indican que los E2F tradicionalmente considerados como represores, también pueden inducir la transcripción de otros genes regulados por E2F. La localización subcelular de E2F varía según el tipo de E2F a lo largo del ciclo celular, por ejemplo, E2F1-E2F3 tienen localización principalmente nuclear, mientras E2F4 se presenta en el citosol y solamente migra al núcleo en Go (100).

La acción de E2F1-3 favorece la expresión de genes necesarios durante la fase S y acopla la progresión del ciclo celular con la transcripción de los genes involucrados. Como reguladores clave de la progresión del ciclo celular, la familia de factores E2F también interviene en la regulación de la proliferación celular. Además de la regulación de genes relacionados con el ciclo celular (Ciclina D1, Jun, myc, Ciclina E1, cdk2, mcm2-7, PCNA, Rb, etc.) también se encuentran entre sus genes blanco, algunos involucrados con daño al ADN y puntos de control (BCRA1,2, p53), apoptosis (caspasa 3, 7 y 8, Bad, APAF, Bcl-2), diferenciación (PPAR- γ) y desarrollo (HOXA 5-11) (101).

La acción de la vía de señalización E2F/Rb en oncogénesis ha sido alimentada, tanto por evidencias obtenidas con líneas celulares y ratones transgénicos, como mediante el análisis de tumores humanos. La actividad desregulada de E2F se ha relacionado con un peor pronóstico en diferentes tipos de cáncer en humanos (96).

La vía de E2F y de NF- κ B se encuentran interconectadas. Es así que p65 tiene la capacidad de interactuar con E2F1-E2F3 e inhibir su actividad, ya que impide la acción de los cofactores HATs (102). Por otro lado, E2F4 puede ser fosforilado por IKK induciendo su translocación al núcleo (102). La interacción entre p65 y E2F, impide la formación del heterodímero activo p65/p50. Adicionalmente, evidencia reciente sugiere que existe una regulación coordinada del ciclo celular. La interacción con E2F regula la actividad de NF- κ B en las diferentes etapas del ciclo. En fase S, la respuesta de NF- κ B se encuentra retrasada o reprimida y se observa interacción de p65 con E2F4. Por otro lado, en la transición G1/S, NF- κ B se encuentra activo, lo que resulta en un ciclo celular más largo y sincronizado entre las células (103).

Antecedentes

Hallazgos previos realizados en el laboratorio en el que se desarrolló esta tesis doctoral sugirieron una regulación de NF-κB por proteínas FKBPs inspirada en el mecanismo de activación de los RE modulado por FKBP51 y FKBP52. Los resultados mostrados en las Figuras I.14 y I.15 impulsaron la formulación de los objetivos de esta

tesis. En la Figura I.14.a y 14.b se muestran ensayos de gen reportero para la actividad transcripcional de NF-κB en células Hek293T transfectadas con plásmidos de expresión para FKBP51, FKBP52 o el vector vacío y estimuladas con PMA (100 ng/ml). Los resultados indican un efecto potenciador de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B estimulada por PMA, y un efecto antagónico por la sobreexpresión de FKBP51. A su vez, en la Figura I.15 y en concordancia con lo descripto para los RE, en ensayos de inmunofluorescencia indirecta para células Hek293T transfectadas con plásmidos codificantes para p65 y FKBP51, FKBP52 o el vector vacío en presencia de PMA (100 ng/ml) mostraron un efecto inhibitorio de FKBP51 sobre la translocación nuclear de p65, y una mayor retención nuclear de p65 por la sobreexpresión de FKBP52. La similitud entre estos resultados y la conocida regulación de los RE por FKBPs constituyeron la primera evidencia de que FKBP51 y FKBP52 podrían regular la actividad de este factor de transcripción de forma similar a su acción sobre los RE. Los ensayos de inmunoprecipitación demostraron que plas IMMs co-inmunoprecipitan con p65 de manera funcional, es decir FKBP52 reemplaza a FKBP51 en el complejo cuando las células son estimuladas. En su conjunto, estos resultados motivaron el desarrollo de los objetivos y la hipótesis de esta tesis doctoral, que en general buscan desentrañar el mecanismo subyacente en la regulación de NF- κ B por FKBP51 y FKBP52.



Figura I.14. Efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre la activación transcripcional de NF- κ B estimulada con PMA. a. Ensayo de gen reportero para NF- κ B en células Hek293T transfectadas con: a). 0,1 a 1,0 µg de plásmido codificante para FKBP51 o vector vacío, y tratadas con 100 ng/ml PMA durante 6 horas. b). 0,1-1,0 µg de plásmido codificante para FKBP52 o vector vacío y tratadas con 100 ng/ml PMA durante 6 horas. Los resultados son la media ±SEM (n=5) del cociente entre la actividad de

luciferasa y β-galactosidasa, relativizados al grupo de células transfectado con el vector vacío y tratado con PMA.



Figura I.15. Efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre la translocación nuclear de p65 inducida por PMA. Cuantificación correspondiente a ensayos de inmunofluorescencia indirecta para p65 en células transfectadas por los plásmidos de expresión para FKBP51, FKBP52 o el vector vacío. Los resultados se expresan como el porcentaje de células con localización nuclear de p65 ± ES en función del tiempo de tratamiento con PMA (100 ng/ml).

Referencias: Células transfectadas con vector vacío (círculo)), plásmido codificante para FKBP51 (cuadrado) o para FKBP52 (triángulo).

Materiales y Métodos

<u>Materiales</u>

1. Líneas celulares

- Hek293T: Línea celular humana inmortalizada a partir de células embrionarias de riñón. Esta línea sobreexpresa constitutivamente el antígeno T de SV40 y cuenta con un gen de resistencia a neomicina (neo).
- Hek293: Línea celular humana inmortalizada a partir de células embrionarias de riñón. No sobreexpresa el antígeno T de SV40 ni resistencia presenta el gen neo.
- Jurkat: Línea celular humana proveniente de sangre periférica de un paciente con leucemia linfoblástica aguda.
- Hek293 WT: Denominación dada a la línea Hek293 en contraposición a las líneas estables generadas a partir de esta.
- Hek293 FKBP51: Línea celular generada en este trabajo de tesis doctoral a partir de la línea parental Hek293 por sobreexpresión estable de la proteína FKBP51. Se obtuvieron 3 clones independientes (clon 1, 2 y 3) de Hek293 FKBP51. La línea Hek293 fue transfectada con el vector pCI-neo hFKBP51 y seleccionada con el antibiótico G418.
- Hek293 pCI-neo: Línea celular generada en este trabajo de tesis doctoral a partir de la línea Hek293 que fue transfectada en forma estable con el vector pCI-neo y seleccionada con el antibiótico G418.

2. Plásmidos

- pNF-κB *cis reporter*. Plásmido reportero de la actividad transcripcional de NF-κB. Cuenta con sitios de respuesta κB río arriba del gen de luciferina. Contiene el gen de resistencia a Ampicilina (Amp^r). Adquirido a Stratagene, La Jolla, CA,USA, Cat. 219078-51
- pSV-βGal: Plásmido codificante para la enzima β-galactosidasa. Contiene la secuencia del gen LacZ río abajo del promotor viral SV40. Permite normalizar los ensayos de gen reportero por eficiencia de transfección. Contiene el gen Amp^r.

- pCI-neo: Vector para clonado que cuenta con el gen de resistencia neo. Se utilizó como <u>vector vacío</u>. Contiene el gen Amp^r.
- pCI-neo hFKBP51: Vector pCI-neo que contiene el ORF (Open Reading Frame) de FKBP51 humana salvaje.
- pCI-neo hFKBP52: Plásmido codificante para la proteína FKBP52 humana salvaje.
- Plámidos codificantes para proteínas FKBPs mutantes generados por el laboratorio del Dr. David Smith y facilitados por el Dr. Marc Cox (Universidad de Texas, El Paso, EE.UU.):
 - pCI-neo hFKBP51 K352A: mutante de FKBP51 sin capacidad de unión a Hsp90.
 - pCI-neo hFKBP51: doble mutante puntual de FKBP51 sin actividad enzimática PPIasa.
 - pCI-neo hFKBP52 K354A: mutante puntual de FKBP52 sin capacidad de unión a Hsp90.
 - pCI-neo hFKBP52 F67Y: mutante puntual de FKBP52 sin actividad PPIasa.
 - pCI-neo hFKBP52 F130Y: mutante puntual de FKBP52 sin actividad PPIasa.
- pCMV6-*flag*-TPR: Vector que expresa el dominio TPR de la proteína PP5 fusionado al péptido-señal *flag* (DYKDDDDK). Contiene el gen Amp^r. El plásmido recombinante fue brindado por Dr. Michel Chinkers, Universidad de South Alabama, EE.UU.
- p65-HA: Vector con la secuencia correspondiente al ORF de p65 humana fusionada a un tag de histidinas (HA). Contiene el gen Amp^r.
- pcDNA-Ub-HA: Vector pcDNA que codifica para la proteína Ubiquitina fusionada a un *tag* de HA. Presenta el gen Amp^r. La construcción fue generada en el Laboratorio del Dr. Martín Monte, FCEN-IQUIBICEN, Argentina.
- 6×E2F-LUC reporter plasmid: Vector reportero pGL3 que contiene un promotor mínimo TATA y seis sitios de unión para E2F. Además, cuenta con el gen de selección Amp^r. Este vector fue otorgado por el Dr. Martín Monte, FCEN-IQUIBICEN, Argentina.
- pE2F-HA: Vectores que codifican para los factores de transcripción E2F fusionados a un *tag* de HA. Presenta resistencia a ampicilina. Entre los E2F se

encuentran: E2F1-HA, E2F2-HA, E2F3-HA y E2F4-HA, los cuales fueron brindados por el Dr. Martín Monte, FCEN-IQUIBICEN, Argentina.

 shRNA FKBP51: Se utilizó una mezcla de dos vectores de silenciamiento de FKBP51 humana marca Origene con gen de resistencia a kanamicina. Los plásmidos fueron brindados por la Dra. Graciela Piwien-Pilipuk, IByME, Argentina. Los mismos contienen las siguientes secuencias para el silenciamiento de FKBP51:

Cat. del vector shRNA	- Secuencia nucleotídica
FI351902	ACTGGACAGTGCCAATGAGAAAGGCTTGT
FI351903	CTGAACCTGGCCATGTGCTACCTGAAGCT

 shRNA mock: Vector de silenciamiento control con una secuencia azarosa de nucleótidos y resistencia a kanamicina. El vector es marca Origene, Cat. TR20003 y fue otorgado por la Dra. Graciela Piwien-Pilipuk, IByME, Argentina.

3. Anticuerpos

Anticuerpos primarios anti-:

- FKBP52: UP30, anticuerpo de conejo policional, provisto por Dr. K. Leach (Pharmacia and Upjohn Inc.,Kalamazoo, MI)
- Flag: SIGMA, M2 F1804, ratón.
- p65: Santa Cruz, sc-8008, IgG1 monoclonal de ratón y Santa Cruz, sc-372, IgG policional de ratón.
- FKBP51: MG-19, suero policional de ratón y Pierce-Thermo Scientific, PA1-020, IgG monocional de ratón.
- MMP-9: Cell Signalling, (D6O3H) XP 13667, IgG monoclonal de ratón.
- IκBα fosforilada en serina 32 (p-IκB ser32): Cell Signalling (14D4) 2859, IgG monoclonal de ratón.
- ΙκΒα: Santa Cruz, sc-1643, IgG monoclonal de ratón.
- p65 fosforilada en serina 536 (p-NF-κB ser536): Santa Cruz, sc-33020, IgG policional de conejo.
- β-Actina: Santa cruz, sc-47778, IgG monoclonal de conejo.
- GADPH: Santa Cruz, sc-32233, IgG1 monoclonal de ratón.

- HA: Santa Cruz, sc-805, IgG policional de conejo.
- β tubulina: Santa Cruz, sc-5274, IgG_{2b} monoclonal de ratón.
- Hsp90: Stress Marq. Biosciences Inc, smc-149, monoclonal IgG_{2b} de ratón.
- Hsp70: Stress Marq. Biosciences Inc, smc-100, monoclonal IgG de ratón.

Anticuerpos secundarios anti-:

- IgG de conejo cadena liviana acoplado a enzima peroxidasa HRP: Jackson, 211-032-171
- IgG de ratón cadena liviana acoplado a enzima peroxidasa HRP: Jackson, 115-035-174
- IgG ratón acoplado a fluoróforo Alexa488: Sigma, SAB4600387.
- IgG conejo con fluoróforo Alexa 568: Sigma, SAB4600234.

3. Enzimas

- ADN taq-polimerasa: Thermo Fisher Scientific, *Taq DNA polymerase*, EP0402.
- Transcriptasa reversa (RT): Thermo Fisher Scientific, *RevertAid Reverse Transcriptase*, EP0441.
- Fosfatasa alcalina intestinal bovina: Sigma, Cat. P4978.
- RNAsa A

4. Medios y complementos de cultivo celular

- Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT): Sigma, Cat. M2128.
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Cat. 0846.
- RPMI: RPMI Medium 1640, Gibco, Cat. 3606.
- Glutamax 100X: 200 mM L-glutamina dipéptido en NaCl 0,85% p/v.
- Glucosa
- Estreptomicina: Gibco, Cat. 11860-038.
- Penicilina G sódica: Richet, 3MUI ampolla.
- Piruvato de sodio: Sigma, Cat. P76225
- Suero Fetal Bovino: Suero Fetal Bovino Suermer, Internegocios S.A.
- Hepes: Amresco. Cat. 0511.
- Tripsina
- OptiMEM

- PEI: Polietilimina lineal, Polysciencies, Cat. 9002-98-6.
- Poli D-lisina hidrobromuro (Polilisina D): Sigma, Cat. P1149.

5. Primers

- Primers aleatorios de 6 nucleótidos: Gen Biotech, Random Primer 6mer.
- MMP-9: *primer* para la secuencia de ARNm transcripta a partir del gen de MMP-9 humano.
- Bax: *primer* para la secuencia de ARNm transcripta a partir del gen de Bax humano.
- Actina: *primer* para la secuencia de ARNm transcripta a partir del gen de β-actina humano.

Las secuencias nucleotídicas de los *primers* se muestran en el apartado correspondiente a los ensayos de PCR en tiempo real.

6. Kit comerciales

Kit para la extracción de ADN plasmídico a mediana escala (midiprep): Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System: Promega, Cat. A7640

7. Extracción de ARN

Solución para la extracción de ARN total: *TRIzol Reagent*, Thermo Fisher Scientific, Cat. 15596026.

8. Reactivos generales

- 2- amino- 2 hidroximetil 1,3-propanodiol (Tris): Applichem, Cat. A2264.
- 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI):
- Acetato de potasio: Anedra, Cat. 7013
- Ácido aminoacético: Biopack, Cat. 56-40-6.
- Ácido clorhídrico 37% (HCl): Anedra, Cat. 6050.
- Ácido etilendiaminotetra acético (EDTA): Biopack, Cat. 1604.7.
- Ácido etilenglicol tetracético (EGTA): Mallinckrodt.
- Ácido fosfórico concentrado: Biopack, Cat. 7664-38-2.
- Ácido para-cumárico: Sigma Cat. C9008
- Acrilamida: Sigma, Cat. A8887.
- Agar-Agar: Ernesto Van Rossum (VR)
- Agarosa: Sigma, Cat. A-6877.

- Ampicilina: Trifacilina, Bagó, Cat. 953 474 A.
- Azida sódica
- Azul de Bromo fenol: Merck, Cat. 8122.
- Azul de Tripán (*Trypan Blue*): Mallinckrodt, Cat. 9020.
- β-mercaptoetanol: Biopack, Cat. an 9545.06
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃): Biopack, Cat. 1636.08
- Bisacrilamida: Sigma, Cat. M7256.
- Bromuro de etidio (BrEt): Invitrogen, Cat. 15585-011.
- Cloruro de Calcio (CaCl₂): Sigma, Cat. C-1016.
- Cloruro de Magnesio (MgCl₂): Sigma, Cat. M-8266.
- Cloruro de Potasio (KCI): Cicarelli, Cat. 867214.
- Cloruro de Sodio (NaCl): Merck, Cat. 6404 y Cicarelli, Cat. 7647-14-5.
- Cloroformo: Dowril, Cat. 67-66-7.
- Coomasie Brillant Blue G-250: Sigma, Cat. B0770.
- Ditiotreitol (DTT)
- Dimetil sulfóxido (DMSO): Biopack, Cat. 9920.08.
- Etanol 100%: Biopack, Cat. 64-17-5.
- Extracto de levadura: Britania, Cat. B0100606.
- Fosfato dibásico de potasio anhidro (K₂HPO₄): Anedra, Cat. 6517.
- Fosfato dihidrógeno de potasio (KH₂PO₄): Merck, Cat. 4873.
- Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na₂HPO₄): Anedra, Cat. 7182.
- Fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄): Mallinckrodt, Cat. 7892.
- Glicilglicina: Sigma, Cat. G-1002.
- Hidróxido de sodio (NaOH): Cicarelli, Cat. 843.
- Igepal: Sigma, Cat. L3021.
- Inhibidores de proteasas: cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Cat. 11873580001.
- Isopropanol: Biopack, Cat. 9717.08.
- Luciferina: Sal potásica de luciferina de escarabajo, Promega, Cat. E160A.
- Luminol: Sigma-aldrich, Cat. 123072.
- Marcador peso molecular para proteínas: PageRuler Prestained Protein Lader, Fermentas, Cat. SM0671.

- Marcador de peso molecular 100 pb para ácidos nucleicos
- Membrana de Polivinildifluoruro (PDVF): Immobilon-P® Millipore, Cat. IPVH00010.
- Metanol: Cicarelli, Cat. 139110.
- Molibdato de sodio: R´edel-de Haën.
- Mowiol 4-88: Polysciences, Inc. Cat.777.
- *orto*-nitrofenil β-D-galactopiranosido (ONPG): Sigma, Cat. N1127.
- Peróxido de Hidrógeno (H2O2) 30% p/v (100 vol): Biopack, Cat. 7722-84-1
- Persulfato de Amonio (APS): Biopack, Cat. 1716.06.
- Peptona de carne por digestión pancreática (Peptona de Carne): Merck, Cat.
 1.07214
- Polioxietilenglicolsorbitano monolaurato (Tween 20): Anedra, Cat. 7614.
- TEMED: Sigma, Cat. T22500.
- Tritón x100: Biopack, Cat. 20002.08.
- Sero-albúmina bovina (BSA): Sigma, Cat. 05470.
- Sulfato de Magnesio (MgSO₄): Sigma, Cat. M7506.
- Sulfato de Kanamicina (kanamicina): Gibco, Cat. 11815-024.

<u>Métodos</u>

1. Obtención de plásmido

1.a Preparación de Bacterias Competentes

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α , la que se caracteriza por presentar alto número de copias de ADN plasmídico. Las bacterias fueron cultivadas en medio sólido LB-agar (agar 1,2 p/v –triptona 1% p/v –extracto de levadura 0,5% p/v – NaCl 0,5% p/v) sin antibiótico durante 16 horas a 37°C.

Se preparó un pre-cultivo a partir de una colonia aislada de la placa de LB-agar, y se inoculó en 5 ml de medio SOB (peptona de carne 2% p/v –extracto de levadura 0,5% p/v – NaCl 0,01 M – KCl 2,5 mM). La suspensión bacteriana se incubó durante 16 horas a 37°C y agitación constante a 200 rpm.

Se tomaron 3 ml del pre-cultivo crecido, los cuales se inocularon en 200 ml de medio SOB. Las bacterias fueron cultivadas a 37°C y 200 rpm hasta una densidad óptica (DO) de 0,3. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C.

El precipitado de bacterias fue incubado en hielo durante 10 minutos y luego resuspendido en 40 ml de *Buffer* CCMB 80 (CaCl₂ 80 mM –MnCl₂ 20 mM). Las bacterias en CCMB 80 se incubaron nuevamente en hielo durante 20 minutos.

El sobrenadante fue removido mediante centrifugación a 3.000 xg durante 10 minutos a 4°C, y el precipitado de bacterias fue resuspendido nuevamente en 14 ml de *buffer* CCMB 80. Se prepararon alícuotas a partir de la suspensión bacteriana en CCMB 80 en tubos *eppendorf* con 100 µl por tubo. A continuación, los tubos fueron sumergidos en nitrógeno líquido durante unos segundos.

Finalmente, las bacterias quimio-competentes fueron reservadas en un freezer a - 80°C hasta el momento de realizar la transformación con los plásmidos de interés.

1.b Transformación de Bacterias Competentes.

Unos 100 µl de Bacterias compententes *Escherichia coli DH5* α reservadas a - 80°C en buffer CCMB 80 fueron incubadas con 1 µg del plásmido a transformar durante 20 minutos en hielo. A continuación, se sometió a las bacterias a un choque térmico que consistió en un pasaje durante 90 segundos por un bloque térmico a 42°C y en una incubación posterior durante 5 minutos en hielo.

La recuperación de las bacterias competentes se llevó a cabo por el agregado de 100 μ l de medio de cultivo SOC (peptona de carne 2% p/v -extracto de levadura 0,5% p/v – NaCl 0,05% p/v –KCl 2,5 mM) y la incubación de la suspensión durante una hora a 37°C.

La selección de las bacterias transformadas se realizó en un cultivo de medio sólido de LB-Agar suplementado con el antibiótico correspondiente según el gen de resistencia presente en el plásmido de interés. Entre 50 y 200 µl de las bacterias transformadas se plaquearon con rastrillo en LB-agar y se dejaron crecer las colonias durante 16 horas a 37 °C. Se realizaron los controles correspondientes de viabilidad y de resistencia: se plaqueraron células transformadas en medio LB-agar sin antibiótico para el control de viabilidad, y bacterias no transformadas en medio sólido con antibiótico de selección para el control de resistencia.

Las colonias aisladas obtenidas luego de la transformación se repicaron en 3 ml de medio LB líquido (triptona 1% p/v –extracto de levadura 0,5% p/v –NaCl 0,5% p/v) con antibiótico, se incubaron a 37°C durante 16 hs., con agitación constante.

Se obtuvo una eficiencia de transformación con las bacterias competentes realizadas alrededor de 4,28 x 10⁴ unidades formadoras de colonias (UFC)/µg.

Una fracción de cada uno de cultivos obtenidos a partir de colonias únicas se reservó a -80°C en una solución de glicerol 50% v/v y LB 50% v/v. 1 ml del cultivo fue utilizado para la determinación de las bacterias transformadas mediante la obtención de plásmido.

1.c Determinación de bacterias transformadas: Miniprep.

Para la detección de las bacterias efectivamente transformadas, se realizó una purificación rápida a baja escala de plásmido o *Miniprep*. Con dicho objetivo, se centrifugó 1 ml del cultivo de bacterias a 10.000 x g por 5 min, y se resuspendió el precipitado resultante en 250 µl de Solución de Resuspensión (Tris-HCl 50 mM - EDTA 10 mM, pH 7.5, RNAsa A 100 µg/ml). Se agregaron 250 µl de Solución de Lisis (NaOH 200 mM –SDS 1 % p/v) a la suspensión anterior, y se mezcló por inversión. Seguidamente, se agregaron 300 µl de Solución de Neutralización (acetato de potasio 3 M pH 5,5), se agitó durante un minuto, y finalmente se centrifugó a 10.000 xg durante 15 minutos. Se agregaron 500 µl de isopropanol al sobrenadante obtenido, y se centrifugó durante 30 minutos a 15.000 xg para favorecer la precipitación del ADN. El pellet obtenido se lavó con 500 µl de etanol 70% y se centrifugó a 14.000 xg durante 10

minutos. Posteriormente, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, y luego se resuspendió en 15 µl de agua de doble ósmosis estéril.

La presencia de ADN plasmídico se verificó por electroforesis en gel de agarosa: agarosa 2% p/v en solución TAE (Tris base 0,8 mM –acético glacial 0,114 % p/v –EDTA 2 µM, pH 8) al 1 % p/v con 0,5 µg/ml de BrEt. Cada muestra se preparó por adición de Solución de Siembra para ADN (30% v/v glicerol - azul de bromofenol). Las condiciones de la corrida electroforética fueron: voltaje constante de 60 V durante 30 min. El gel de agarosa fue revelado en un equipo transiluminador UV, GBOX Syngene.

De aquellos clones que resultaron con plásmido, se procedió a la purificación de plásmido a mayor escala o *Midiprep*.

1.d Purificación de plásmido: Midiprep.

Se partió de un cultivo generado a partir de bacterias congeladas en glicerol 50% v/v. Se crecieron las bacterias en 100 ml LB con el antibiótico correspondiente durante 16 horas a 37°C y agitación.

Para la purificación de ADN plasmídico, se utilizó el kit comercial *Wizard*® *Plus Midipreps* DNA *Purification System* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

El ADN obtenido fue resuspendido en agua estéril de doble ósmosis y cuantificado en un espectrofotómetro por absorbancia a 260 nm (A₂₆₀), cuya concentración fue determinada por el equipo Amersham *Biosciences Ultrospec* 1100 *pro* en unidades de nanogramos de ADN por microlitro de solución. Se evaluó la calidad del plásmido obtenido a partir de la relación de absorbancias A₂₆₀/A₂₈₀ para la detección de proteínas contaminantes y A₂₆₀/A₂₃₀ para contaminantes de la solución, en ambos casos se consideró aceptable una relación de absorbancias entre 1,5 y 2.

2. Cultivo celular

2.a Línea celular Hek293T y Hek293

Las células fueron cultivadas en botellas T25 o T75 en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino 10 % v/v, penicilina 0,1 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml. Las botellas se mantuvieron en una incubadora a 37°C con 5% CO₂. El repique se realizó con solución comercial de tripsina (tripsina 0,025% - EDTA) cuando se alcanzó una confluencia aproximada del 80%, previo lavado con *buffer* salino PBS (14 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,43 mM Na₂HPO₄, 0,15 mM KH₂PO₄ pH 7,4).

2.b Líneas celulares estables: generación y cultivo.

Las líneas celulares Hek293 pCI-neo y los 3 clones de Hek293 FKBP51 se generaron a partir de la línea celular parental Hek293 WT. Las células Hek293 WT fueron sembradas en placa *multiwell* de 6 pocillos y transfectadas con 2 µg de los plásmidos pCI-neo o pCI-neo hFKBP51, respectivamente. La transfección se llevó a cabo según el protocolo de transfección con PEI. La selección se inició con 400 µg/ml de antibiótico G418 luego de 48 horas post-transfección. Las células se mantuvieron en un régimen de selección durante 2 semanas, realizando cambio de medio y antibiótico en forma regular cada 3 días. Se realizó un control de células Hek293 WT no transfectadas mediante el tratamiento con el antibiótico de selección, y se verificó la muerte de las mismas.

A lo largo de las 2 semanas en las que tuvo lugar la selección con antibiótico, se observó la muerte de alrededor de un 95% de las células, y la formación de colonias aisladas. Luego, cada una de las colonias fue repicada en una placa de 96 pocillos. En este punto, se aplicó el régimen de mantenimiento con 400 µg/ml G418 cada 7 días, hasta que las células alcanzaron confluencia para ser transferidas a una botella de cultivo T25.

Las líneas celulares estables generadas se congelaron en SFB con 10% DMSO y con el cultivo restante se evaluó la sobreexpresión de FKBP51 por W*estern blot* con anticuerpo específico.

2.c Línea celular Jurkat.

Las células Jurkat se cultivaron en botellas T75 con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino decomplementado, 10 mM Hepes, 1 mM piruvato, 2,5 g/L glucosa y *glutamax*® 1X. Los linfocitos se repicaron al alcanzar una densidad de 3 x 10⁶ células por ml de medio. Para el repique se centrifugaron las células y se resuspendieron en el medio necesario para alcanzar a una densidad de 2 x 10⁵ células por ml. El suero se decomplementó en un baño térmico a 60°C durante 30 minutos.

3. Transfección

3.a Transfección por el método de precipitación con fosfato de calcio

La transfección de la línea celular Hek293T se realizó por el método de precipitación con fosfato de calcio como se detalla a continuación. Se preparó una solución acuosa con el plásmido a transfectar o la mezcla de plásmidos, a la cual se le agregó primero una solución de CaCl₂ (0,25 M) hasta una concentración final de 0,025

M CaCl₂. Posteriormente, se adicionó el volumen correspondiente de una solución HBS 2X (Hepes 50 mM -Na₂HPO₄ 1,5 mM – NaCl 280 mM) hasta alcanzar una concentración final de HBS 1X. La mezcla resultante fue homogeneizada por burbujeo con pipeta de forma manual durante 30 segundos. Luego de 10 minutos de reposo en hielo, se agregó la mezcla al medio de cultivo de células a una confluencia del 40 %.

Las transfecciones se realizaron de forma de que los diferentes grupos ensayados dentro de un experimento fueran transfectados con idéntica masa total de ADN. Los controles denominados <u>vector</u>, que se muestran en la sección resultados, corresponden a los grupos de células transfectadas con el <u>vector vacío</u> (pCI-neo). Se agregó la cantidad suficiente del vector vacío para que la masa total de ADN fuese igual para todos los grupos de células transfectadas.

3.b Transfección con PEI

Las líneas celulares Hek293 WT y las líneas estables Hek293 pCI-neo y FKBP51 fueron transfectadas con PEI de la siguiente forma: se preparó una mezcla en medio OptiMEM con los plásmidos a transfectar, y posteriormente se agregaron 2µg de PEI por cada µg de ADN. La mezcla se homogeneizó por agitación y se adicionó al medio de cultivo de una placa con 40% de confluencia celular.

De igual forma que en el procedimiento de transfección con fosfato de calcio, se transfectó con el <u>vector vacío</u> (pCI-neo) con el objetivo de que todos los grupos de células transfectadas recibieran idéntica cantidad de masa de ADN.

4. Determinación de la actividad transcripcional de NF- κ B y de E2F.

Para la determinación de la actividad transcripcional, se utilizaron los plásmidos reportero que cuentan con el gen de luciferasa río abajo de promotores de respuesta a NF- κ B o a E2F, según corresponda. Las células fueron co-transfectadas con el vector reportero y con un plásmido codificante para la enzima β -galactosidasa. La actividad enzimática de β -galactosidada permite relativizar los resultados de actividad de luciferasa a la eficiencia de transfección de cada determinación.

Para evaluar la actividad transcripcional de NF- κ B se sembraron células Hek293T en una placa de 12 pocillos, y se transfectaron con 500 ng del plásmido reportero pNF- κ B cis *reporter*, 140 ng de plásmido pSV- β Gal con cantidades variables de vectores de expresión para las proteínas FKBP o el péptido TPR, mediante el método de precipitación

con fosfato de calcio. Las cantidades óptimas de los vectores pNF- κ B cis *reporter*, pSV- β Gal y los vectores de expresión fueron determinadas previamente en el laboratorio. 24 horas post-transfección, las células fueron tratadas con PMA (100 ng/ml) o con TNF- α (10 ng/ml) durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con PBS. Se agregaron 100 µl Solución de Lisis para Ensayos de Luciferasa (K₂HPO₄ 100 mM pH 7.8 – Tritón X100 0,2% v/v - DTT 1mM) a cada pocillo, y se congelaron las células a -20°C durante 16 horas. Las muestras fueron utilizadas para la medición de la actividad enzimática de luciferasa y de β -galactosidada.

Para el ensayo de actividad transcripcional de E2F, células Hek293 WT fueron sembradas en placas de 24 pocillos y transfectadas con 250 ng del vector reportero 6×E2F-LUC *reporter plasmid*, 70 ng de plásmido pSV-βGal, y diferentes cantidades de los vectores de expresión para proteínas FKBP. La cantidad de plásmido de expresión para E2F-HA se determinó para cada E2F (E2F1-4). Se tuvo en consideración la actividad transcripcional obtenida en función de la masa de plásmido E2F-HA transfectada.

La transfección de 20 ng de E2F2-4-HA presentó un incremento en la actividad transcripcional entre 200 y 420 % respecto al grupo sin sobreexpresión del factor de transcripción (vector, Figura M.1.b). La transfección de 20 ng de E2F1-HA mostró un aumento de la actividad transcripcional (1000%) muy superior al resto de los factores de la familia E2F evaluados (Figura M.1.a). Con el objetivo de evaluar el efecto de la sobreexpresión de las proteínas FKBP sobre la actividad transcripcional de E2F, se decidió disminuir la masa de plásmido pE2F1-HA para alcanzar niveles de actividad transcripcional de E2F1 semejantes a los de E2F2-4.



Figura M.1: Actividad transcripcional de E2F1-4 en función de la masa de plásmido pE2F1-4-HA.

a. Actividad transcripcional de E2F1 en función de la masa de plásmido E2F1-HA transfectada (5, 10 y 20 ng).

b. Actividad transcripcional de E2F luego de la transfección de 5 ng del plásmido de expresión para E2F1, y 20 ng de los vectores codificantes para E2F2-HA, E2F3-HA y E2F4-HA.

Luego de 24 horas post-transfección, se lavaron las células con PBS y se trataron con 50 μ l de solución de lisis para luciferasa por pocillo. Las muestras fueron congeladas a -20°C durante 16 horas para luego proceder a la medición de actividad enzimática de luciferasa y de β -galactosidasa.

4.a Determinación de la actividad enzimática de luciferasa

La incubación de los lisados celulares con el sustrato luciferina permitió cuantificar la actividad de la enzima luciferasa presente en las muestras a partir de la aparición de quimioluminiscencia. Un 50% del volumen de lisado celular, se incubó en presencia de 36 µl de la solución A (glicinglicina 25 mM – MgSO₄ 15 mM – EGTA 4 mM– Tritón x-100 0,27% v/v – K₂HPO₄ 15 mM – ATP 0,2 mM – DTT 1 mM), y 9 µl de la solución B (glicilglicina 25 mM – MgSO₄ 15 mM – DTT 2 mM– luciferina 0,1 mM) en una placa de 96 pocillos para la medición de luminiscencia. La detección de quimioluminiscencia se realizó en un equipo Promega Glomax *MultiDetetion System*.

Se sembraron dos pocillos con solución A y solución B en ausencia de extracto celular que se consideraron como blanco de la medición de la actividad enzimática de

luciferasa. El valor de luminiscencia obtenido para el blanco, fue restado a las mediciones obtenidas de los distintos grupos y tratamientos ensayados.

4.b Determinación de la actividad enzimática de β-galactosidasa

La actividad enzimática de β -galactosidasa se cuantificó por la medición de absorbancia a partir de la aparición de color en presencia del sustrato ONPG. Se tomaron 20 µl del lisado celular para la determinación de la actividad enzimática de β -galactosidasa que fueron incubados en una placa de 96 pocillos transparente con 100 µl de la Solución PM2 (Na₂HPO₄ 60 mM - NaH₂PO₄ 40 mM – KCl 10 mM – MgSO₄ 1 mM – β -mercaptoetanol 1 µl/ml) y ONPG. 1 mg/ml. La medición de absorbancia a 420 nm se realizó en el equipo BMG labtech Fluostar Optima.

Se sembraron dos pocillos con Solución PM2 y ONPG en ausencia de extracto celular que se consideraron como blanco de la medición de la actividad enzimática de β -galactosidasa. El valor de absorbancia obtenido para el blanco fue restado a las mediciones obtenidas para los distintos grupos y tratamientos ensayados.

4.c Calculo de la actividad transcripcional

La actividad transcripcional se determinó como el cociente entre la medición de la actividad enzimática de luciferasa menos el blanco y la de β -galactosidasa menos el blanco expresada en unidades arbitrarias (u. a.). En particular, la actividad transcripcional de NF- κ B para la condición transfectada con el vector vacío sin estimulación con PMA o TNF- α (control) fue restada a la actividad transcripcional calculada para los distintos grupos y/o tratamientos. Finalmente, a la condición estimulada con PMA o TNF- α le fue un valor arbitrario de 100 u.a., y la actividad transcripcional de las demás condiciones fue relativizada en consecuencia.

La actividad transcripcional de E2F fue calculada de forma semejante a la de NF-KB. Se consideró como condición control a las células sin transfectar con el factor de transcripción. Luego de haber determinado las cantidades óptimas de plásmido de expresión para E2F1/4-HA (Figuras M.1.a y b), la actividad transcripcional fue relativizada a la condición control. La actividad transcripcional calculada para la condición control fue restada a la actividad transcripcional de los distintos grupos. Al grupo transfectado con el factor de transcripción en ausencia de sobreexpresión de FKBPs, le fue asignado arbitrariamente el valor de 100 u.a, y los valores de actividad transcripcional de los grupos y tratamientos restantes fueron relativizados en consecuencia.

5. Preparación de fracciones totales de proteínas para Western blot.

Para la preparación de fracciones totales de proteínas para células adherentes, las mismas se levantaron con espátula en PBS, y se centrifugaron durante 4 minutos a 2.000 xg. Las células no adherentes fueron centrifugadas 4 minutos a 2.000 xg junto con el medio de cultivo, y el pellet fue luego lavado con PBS mediante centrifugación.

El pellet de células resultante en ambos casos se resuspendió en Solución de Lisis (Hepes 50 mM - NaCl 150 mM - EDTA 0,5 mM – Igepal 1% v/v - DTT 1 mM - inhibidores de proteasas 1X), y luego se congeló a -80°C durante 40 minutos. Una vez descongeladas, las células fueron sometidas a ruptura mecánica con *vortex* cada 5 minutos a lo largo de media hora. Finalmente, el lisado celular fue centrifugado durante 30 minutos a 15.000 xg a 4°C y el sobrenadante fue recuperado para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

5.a Determinación de proteínas totales por el método de Bradford

La determinación de proteínas se realizó en base al método de Bradford. Las muestras y soluciones para la calibración del método fueron incubadas con 200 µl reactivo de Bradford preparado en el laboratorio (*Coomasie Brillant Blue* G-250 100 mg/L, ácido fosfórico 85% 100ml/L, etanol 95% 50ml/L), de forma que el volumen final para todas las muestras resultase semejante. Se determinó la cantidad de proteína mediante la medición de absorbancia a 600 nm (A₆₀₀) en placa *multiwell* de 96 pocillos en el equipo TSOH, Micro Plate Reader MPR A4i. Se utilizó una concentración conocida de proteína sero-albúmina bovina (BSA) para determinar la cantidad de proteína de los lisados celulares a partir de la medición de la absorbancia del reactivo de Bradford. Se graficaron los resultados de A₆₀₀ en función de la masa de BSA (0,2 µg-1,4 µg proteína), los cuales se ajustaron por el método de cuadrados mínimos a una recta (A₆₀₀ = x. *k* + m), y se obtuvo el valor de la constante *k* y de la ordenada m. La ecuación obtenida permitió determinar la cantidad de proteína (x) de los lisados a partir de la medición de A₆₀₀ de los mismos.

En función de la concentración de proteína de los lisados celulares calculada en base al método de Bradford, se determinó el volumen de muestra a sembrar en cada caso para la electroforesis de proteínas.

5.b Tratamiento con fosfatasa alcalina.

Para el ensayo con fosfatasa alcalina, las células fueron lisadas con Solución de Lisis sin EDTA (Hepes 50 mM - NaCl 150 mM -Igepal 1% v/v - DTT 1 mM - inhibidores de proteasas 1X) mediante la utilización del vortex durante 30 minutos en intervalos de 5 minutos. El lisado fue centrifugado durante 30 minutos a 4°C y 15.000 xg. La concentración de proteínas del sobrenadante fue determinada por el método de Bradford según el inciso 6 de la presente sección. Se incubaron 80 µg de proteína del lisado celular con 30 unidades de fosfatasa alcalina en 30 µl de Solución CIP (Tris-HCl 1mM pH 9, 1mM MgCl₂, inhibidores de proteasas 1X) a 37°C durante 1 hora. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, los lisados fueron hervidos con *Buffer* muestra para proteínas 4X durante 5 minutos y evaluados con el ensayo de *Western blot*. Se realizó un control de lisado sin fosfatasa alcalina, incubado en Solución CIP a 37°C, y otro control sin fosfatasa alcalina y sin incubación a 37°C para descartar cambios en la movilidad electroforética por degradación proteica.

8. Ensayo de Western blot

8.a Preparación de muestras para Western blot

Para la detección de proteínas con anticuerpos específicos mediante el ensayo de *Western blot*, se utilizaron los lisados celulares obtenidos según el protocolo de preparación de fracciones totales de proteínas (Sección Materiales y Métodos, inciso 5.). Se agregó el volumen necesario de *Buffer* muestra 4X para proteínas (Tris-HCl 250 mM pH 6.8 – 2-mercaptoetanol 5% v/v –SDS 4% p/v - glicerol 40% v/v – azul de bromofenol 0,4% p/v) al extracto en solución de lisis, y las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 95°C.

8.b Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-page

La electroforesis de realizó en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El gel concentrador (4% p/v acrilamida:bisacrilamida (29:1) - Tris-HCI

125 mM pH 6.8 - SDS 0,1% p/v – TMED 0,001% v/v - APS 0,1% p/v) y el gel separador (10% a 15% p/v acrilamida:bisacrilamida (29:1) - Tris-HCl 375 mM pH 8.7 - SDS 0,1% p/v – TMED 0,001% v/v - APS 0,1% p/v) se prepararon en vidrios Bio-Rad de 0,75 mm o 1,5 mm de espesor en el soporte Bio-Rad *MINI-protean casting chamber.*

Luego del armado de los geles, las muestras fueron corridas en una cuba electroforética Bio-Rad *Mini-PROTEAN Tetra Cell Biorad* con la solución de electroforesis (glicina 1,92 M – SDS 1 % p/v - Tris base 250 mM) a voltaje constante entre 80 y 120 V con una fuente de poder Bio-Rad PAL3000.

8.c Transferencia

Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF por transferencia semiseca. La membrana fue previamente hidratada con metanol durante 1 minuto, y luego humedecida con *Buffer* de Transferencia (glicina 39 mM– SDS 0,04 % p/v - Tris base 48 mM– metanol 20 % v/v). La transferencia propiamente dicha se realizó en el equipo Bio-Rad *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* durante 1 hora 30 minutos a voltaje constante (15 V) y 400 mA con papel de filtro marca Whatman.

8.d Incubación con anticuerpos

Las membranas fueron bloqueadas con *Buffer* de Bloqueo para *Western blot* (BSA 0,1% p/v – Tween20 0,4% v/v – EDTA 1 mM - Azida sódica 2% p/v – Tris-HCl 10 mM pH 7.5 – NaCl 100 mM) durante una hora a temperatura ambiente en agitación, previo al agregado de la solución con anticuerpo primario. Se incubó con una solución de anticuerpo primario preparada con una dilución entre 1/1000 y 1/2000 del anticuerpo primario, según el anticuerpo utilizado, en *Buffer* de bloqueo para *Western blot* durante 16 horas a 4°C.

Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween 20 (Tween20 0,4% v/v – EDTA 1 mM – Tris-HCl 10 mM pH 7.5 – NaCl 100 mM) en agitación, previo a la incubación con la solución con anticuerpo secundario. Las soluciones de anticuerpos secundarios conjugados a enzima HRP se prepararon en *Buffer* de Bloqueo para *Western blot* sin azida sódica durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.

El anticuerpo secundario se lavó con TBS-Tween 20 durante 5 minutos con dos repeticiones. El lavado final se realizó en PBS.

8.e Revelado

La membrana fue revelada con una solución *ECL* (Tris HCI 40 mM pH 8.6 – luminol 2,5 mM – ácido p-cumárico 0,4 mM– H₂O₂ 0,02% v/v). La quimioluminiscencia fue adquirida con el equipo FUJIFILM intelligent dark box 2, G-BOX Syngene Chemi-XR5 o con General Electric Amersham Imager 600, según la disponibilidad de los mismos.

Las imágenes obtenidas fueron cuantificadas con el software Image J.

8.f Ensayo de Western blot modificado para la detección de proteínas fosforiladas.

Para los ensayos de *Western blot* donde se evaluó la fosforilación temporal de l κ B α en serina 32 y p65 en serina 536, las muestras fueron procesadas de forma diferente a la explicada anteriormente (sección Materiales y Métodos incisos 5, 6 y 8.e). En particular, se lavaron las células crecidas en pocillos de placa *multiwell*-6 con PBS, y se procedió al agregado de 100 µl de *Buffer* Muestra 2X para proteínas (Tris-HCl 125 mM pH 6.8 – 2-mercaptoetanol 2,5% v/v –SDS 2% p/v - glicerol 20% v/v – azul de bromofenol 0,2% p/v) directamente sobre las células. Posteriormente, los pocillos fueron raspados con espátula, y la mezcla resultante fue transferida a un tubo *eppendorf* de 1,5 ml. Las células fueron sonicadas durante 30 segundos con un sonicador Fisher *Sonic Dismembrator* 300 a una potencia de 50%, y luego hervidas durante 5 minutos a 95°C.

Las muestras fueron ensayadas en electroforesis de gel de poliacrilamida inmediatamente después de haber sido sonicadas y hervidas. La electroforesis y la transferencia se realizaron según se detalló en la presente sección, incisos 8.b y 8.c. El bloqueo de las membranas se realizó con solución de BSA 5% (BSA 5% p/v – Tween20 0,4% v/v – EDTA 1 mM - azida sódica 2% p/v – Tris-HCl 10 mM pH 7.5 – NaCl 100 mM) durante 1 hora en agitación. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó en solución BSA 5% con una dilución 1/1000 de los anticuerpos anti p-I κ B α (ser 32) o p-p65 (ser 536).

La incubación con anticuerpo secundario y el revelado se realizaron según se mencionó en los incisos 8.c y 8.d de la presente sección.

9. Inmunofluorescencia Indirecta

Las células Hek293T fueron sembradas en medio DMEM con suero y antibiótico sobre cubreobjetos previamente tratados durante 30 minutos con una solución de polilisina D 1mg/ml. Luego de 24 horas, las células se transfectaron con 2 µg del plásmido correspondiente al vector vacío, o los plásmidos pCI-neo hFKBP (dónde la FKBP sobreexpresada podría ser: FKBP51, FKBP52 o FKBP52 F130Y), por el método de precipitación con fosfato de calcio. Se utilizaron 7 vidrios por grupo de células para evaluar los distintos tiempos de tratamiento con TNF- α (0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos). Los plásmidos transfectados para cada grupo se muestran en la Tabla 1.

Grupo	Plásmidos transfectados
Vector	pCI-neo
FKBP51	pCI-neo hFKBP51
FKBP52	pCI-neo hFKBP52
FKBP52 F130Y	pCI-neo hFKBP52 F130Y

Tabla 1. Plásmidos transfectados para cada grupo de las células en ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

24 horas post-transfección, las células recibieron un cambio de medio por DMEM sin suero y sin antibiótico, y fueron incubadas con vehículo (tiempo 0 minutos de TNF- α), o con 10 ng/ml TNF- α durante distintos tiempos (15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos). Para estos ensayos, se utilizó TNF- α como agente estimulante de NF- κ B, y no así PMA, ya que el porcentaje de células con localización nuclear de p65 endógeno para las células tratadas con PMA era considerablemente menor (porcentaje máximo de células con localización nuclear de alrededor del 20% para el grupo vector con PMA). Resultados de ensayos de inmunofluorescencia con PMA, mostrados en la Introducción, requerían la sobreexpresión de p65 para incrementar su grado de translocación nuclear con PMA. TNF- α resultó ser un mejor inductor del transporte citoplasma-núcleo de p65 en las condiciones ensayadas y para las células utilizadas.

Una vez cumplido el tiempo de tratamiento con TNF-α o vehículo, los vidrios fueron lavados con PBS y fijados con una solución de para-formaldehído (PFA) 3 p/v % en PBS durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, la solución de PFA 3% fue descartada y el PFA remanente fue neutralizado con una solución de glicina 1% p/v en PBS durante 5 minutos. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS, y posteriormente se procedió a la permeabilización de las células. Con tal objetivo, se incubaron los
portaobjetos con una solución de Tritón x-100 0,1 v/v% en PBS durante 5 minutos, y luego se procedió realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS.

Previo al agregado de los anticuerpos primarios, se bloquearon las muestras durante una hora con solución AFI (20 mM Tris pH 8, 0,63 M NaCI, 1% p/v BSA, 0,05 % v/v Tween 20, 0,02% p/v azida sódica).

Se prepararon las mezclas de anticuerpos primarios para cada tratamiento en solución AFI, según se muestran en la Tabla 2, y se incubaron durante 16 horas en cámara húmeda a 4 °C.

Posteriormente, se lavaron los vidrios 3 veces con PBS durante 5 minutos y se bloqueó con una solución de BSA 1% p/v en PBS. Se incubaron los vidrios con los anticuerpos secundarios correspondientes. Los anticuerpos secundarios utilizados se encuentran conjugados a diferentes fluoróforos, y fueron preparados según la dilución indicada en la Tabla 2 en solución de BSA 1% durante 1 hora y media a 37°C.

Grupos	Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
	Preparados en Solución AFI	Preparados en Solución de
	(factor de dilución).	Bloqueo (factor de dilución).
Vector	a)	a y b)
	-IgG anti-p65 conejo (1/50)	-IgG anti-conejo Alexa 488 (1/100)
	-IgG anti-FKBP51 ratón (1/100)	-IgG anti-ratón Alexa 568 (1/100)
	b)	
	-IgG anti-p65 ratón (1/50)	
	-IgG anti-FKBP52 conejo (1/200)	
FKBP51	-IgG anti-p65 conejo (1/50)	-IgG anti-conejo Alexa 488 (1/100)
	-IgG anti-FKBP51 ratón (1/100)	-IgG anti-ratón Alexa 568 (1/100
FKBP52	-IgG anti-p65 ratón (1/50)	-IgG anti-conejo Alexa 488 (1/100)
	-IgG anti-FKBP52 conejo (1/200)	-IgG anti-ratón Alexa 568 (1/100)
FKBP52	-IgG anti-p65 ratón (1/50)	-IgG anti-conejo Alexa 488 (1/100)
F130Y	-IgG anti-FKBP52 conejo (1/200)	-IgG anti-ratón Alexa 568 (1/100)

Tabla 2: Mezcla de anticuerpos primarios y secundarios utilizada en el ensayo de inmunofluorescencia indirecta según el grupo de células estudiado.

Luego de la incubación con la mezcla de anticuerpos secundarios, los cubreobjetos fueron lavados 3 veces durante 5 minutos con PBS. Posteriormente, los vidrios fueron incubados con DAPI (1 mg/ml en PBS) durante 10 minutos, y a

continuación lavados con PBS durante 5 minutos. Los cubreobjetos con las células fueron montados con solución de Mowiol 4-88 (0,2 g/ml Mowiol 4-88, 0,27 g/ml glicerol, 0,1 M Tris pH 8,5) en porta objetos rotulados.

Las muestras fueron observadas en microscopio de epifluorescencia Olympus IX7. Se obtuvieron imágenes para la cuantificación de las mismas con el software *Image J* (v.1.45). Mediante la utilización del plugin "*cell counter*", las células fueron clasificadas según el grado de localización nuclear de p65 (puntaje de 0 a 3). A las células con localización citoplasmática se les asignó un puntaje igual a cero, y a las células con localización totalmente nuclear, un puntaje igual a 3. Los puntajes 1 y 2 fueron asignados a situaciones intermedias, dónde no se podía determinar que la localización de p65 fuese completamente citoplasmática ni nuclear.

Para cada grupo y tratamiento ensayado se contaron entre 60 y 100 células con su correspondiente puntaje asignado. En los grupos FKBP51, FKBP52 y FKBP52 F130Y se consideraron para la cuantificación exclusivamente las células que sobreexpesaran la FKBP correspondiente. La sobreexpresión de FKBPs se evidenció mediante un incremento de la fluorescencia correspondiente a la marcación realizada en cada caso. El porcentaje de células con localización citoplasmática (puntaje 0), nuclear (puntaje 3) y localización intermedia (puntaje 1 y 2) se graficó en función del tiempo de tratamiento con TNF-α.

10. Co-inmunoprecipitación

Se sembraron 7 x 10⁶ células Jurkat en 10 ml de medio RPMI sin suero y sin antibióticos para la realización del ensayo de co-inmunopreciptación de p65 con proteínas FKBPs y Hsps. Se probaron cuatro tratamientos distintos:

-Control: incubado con cantidad suficiente de vehículo (DMSO)

-PMA: 100 ng/ml en DMSO

-TNF-α: 10 ng/ml en agua de doble ósmosis.

-LPS: 1 µg/ml en agua de doble ósmosis.

La incubación se realizó durante 30 minutos en incubadora a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1.000 xg durante 5 minutos. El medio fue descartado, y las células fueron lavadas con 1 ml de PBS frío mediante centrifugación a 2.000 xg por 5 minutos. El *pellet* de células fue resuspendido en 400 μ l de Solución de Inmunoprecipitación (molibdato de sodio 20 mM – EDTA 1 mM – Hepes 10 mM -1mM DTT - inhibidores de proteasas 1X - pH 7,4). Se realizó una homogeneización mecánica de las células con un *potter* del tipo *douncer*. El lisado fue centrifugado durante 10 minutos a 12.500 xg para descartar restos de membranas y células no homogeneizadas. El lisado obtenido a partir del sobrenadante de cada tratamiento (control, PMA, TNF- α y LPS) fue dividido en 3 fracciones y procesado de la siguiente forma:

- Fracción total: 20 µl de lisado
- <u>No inmune (NI</u>): 180 μl de lisado + 30 μl de proteína A-agarosa (*beads* de proteína A-agarosa 50% en PBS) + 4 μg anticuerpo IgG de ratón no específico.
- Inmune (I): 180 μl de lisado + 30 μl de proteína A-agarosa + 4 μg anticuerpo IgG de ratón anti p65.

La fracción total fue reservada para la realización del ensayo de *Western blot* que se realzó al finalizar la co-inmunoprecipitación. Las fracciones NI e I con la proteína A-agarosa y los anticuerpos correspondientes en cada caso, se sometieron durante 3 horas a agitación en el equipo *LabNet mini Labroller* a 4°C.

Luego de la inmunoprecipitación, se procedió a centrifugar las *beads* de proteína A-agarosa (Sigma, Cat. P3391) durante 2 minutos a 3.000 xg. Se recuperaron las *beads* y se continuó realizando lavados de las mismas con la Solución de Inmunoprecipitación. Los dos primeros lavados se realizaron con 1 ml de la Solución de Inmunoprecipitación en agitación durante 5 minutos a 4°C y centrifugación 5 minutos a 2.500 xg. El último lavado se realizó con vortex suave y centrifugación durante 10 minutos a 12.500 xg. El sobrenadante se descartó con jeringa de 1 ml y aguja de 30 *gauge*. Se agregaron 25 µl de *Buffer* muestra 2X para proteínas a la proteína A-agarosa precipitada, y 20 µl a la Fracción Total. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 95°C, y fueron reservadas para el ensayo de *Western blot*.

11. Ensayo de ubiquitinación

Se sembraron células Hek293T en placas circulares de 100 mm de diámetro. Las mismas fueron transfectadas según el protocolo de transfección con PEI y con los plásmidos correspondientes (Tabla 3) para cada grupo ensayado (vector y FKBP52) durante 48 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con vehículo o con MG132

5 μM por 24 horas (+MG132). Transcurrido el tiempo de tratamiento, las placas fueron lavadas con PBS, y luego levantadas en PBS con espátula.

Grupo	Plásmidos transfectados (masa de plásmido
	por placa)
Vector	pCI-neo 5 µg
	Ub-HA 3 µg
	р65-НА 8 µg
FKBP52	pCI-neo hFKBP52 5 µg
	Ub-HA 3 µg
	р65-НА 8 µg

 Tabla 3. Listado de plásmidos transfectados para los dos grupos de células evaluadas en el ensayo de ubiquitinación.

La suspensión de células se centrifugó a 3.000 xg durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. El ensayo de ubiquitinación continúa con una inmunoprecipitación de p65, realizada en forma similar a la descripta en el ensayo de co-inmunoprecipitación, pero con lavados de mayor astringencia de las *beads* precipitadas. El procedimiento se describe en detalle a continuación.

El *pellet* celular fue resuspendido en 400 µl de Solución de Inmunoprecipitación y se homogeneizó con un *potter* del tipo *douncer*. El lisado fue centrifugado durante 10 minutos a 12.500 xg y el sobrenadante de cada grupo y tratamiento ensayado (vector, vector + MG132, FKBP52 y FKBP52 + MG132) se dividió en 3 fracciones tratadas de la siguiente forma:

- Fracción total: 20 µl de lisado
- No inmune (NI): 180 μl de lisado + 30 μl de proteína A-agarosa + 4 μg anticuerpo IgG de ratón no específico.
- Inmune (I): 180 μl de lisado + 30 μl de proteína A-agarosa + 4 μg anticuerpo IgG de ratón anti p65.

Las fracciones NI e I se mantuvieron en agitación a 4°C durante 3 horas en el equipo *LabNet mini Labroller*.

Luego de la inmunoprecipitación, se procedió a centrifugar las *beads* de proteína A-agarosa durante 2 minutos a 3.000 xg. Se recuperaron las *beads*, y se continuó realizando lavados de las mismas con la Solución de Lavado para Inmunoprecipitación (Tris 10 mM pH 7,4 - EDTA 1 mM - NaCl 150 mM - Tritón x-100 1% v/v - molibdato de sodio 20 mM). Los 3 lavados se realizaron con 1 ml de Solución de Lavado para Inmunoprecipitación en agitación durante 10 minutos a 4°C y centrifugación 5 minutos a 2.500 xg. El sobrenadante se descartó con jeringa de 1 ml y aguja de 30 *gauge*. Se agregaron 25 µl de *Buffer* muestra 2X para proteínas a la proteína A-agarosa precipitada, y 20 µl a la fracción total. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y fueron reservadas para el ensayo de *Western Blot* posterior. Las membranas de PFDV fueron reveladas con anticuerpo anti-HA para la detección de proteínas ubiquitinadas.

12. Determinación de la expresión de ARNm

12.a. Extracción de ARN total

Células Hek293T fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro y transfectadas con 6 μg por placa de plásmido pCI-neo hFKBP51, pCI-neo hFKBP52, pCI-neo hFKBP52 F130Y o pCI-neo. Posteriormente, las células fueron tratadas con TNF-α 10 ng/ml o PMA 100 ng/ml durante 4 o 7 horas, o con vehículo.

Luego de transcurrido el tiempo de tratamiento correspondiente, las células fueron lavadas con PBS. Se adicionaron a continuación, 500 µl de Trizol a cada placa. Las células en Trizol fueron levantadas con espátula y reservadas en tubos eppendorf en freezer de -80°C durante al menos, 16 horas. Posteriormente, las muestras fueron descongeladas e incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 200 µl de cloroformo a cada tubo eppendorf y se homogeneizó con vortex suave durante 15 segundos. Las muestras se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente previa a la centrifugación durante 15 minutos a 4 °C y 12.000 xg. La fase acuosa (superior) fue transferida a un tubo eppendorf nuevo, al cual se le adicionaron 500 µl de isopropanol. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C. El pellet de ARN obtenido fue lavado con etanol 75% v/v con vortex suave, seguido de centrifugación durante 5 minutos a 7.500 xg y 4°C. La solución de lavado fue descartada, y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente hasta que su color viró de blanco a traslúcido. Finalmente, el ARN fue resuspendido en 20 µl de agua estéril marca Roche y calentado a 55°C durante 5 minutos en termobloque. 2µl del ARN extraído se utilizaron para la cuantificación en el equipo con NanoDrop 3000. El equipo determina la concentración de ARN mediante la medición de absorbancia a 260 nm. Se estudió la relación de absorbancia 260/230 nm y 260/280 nm para evaluar la pureza del ARN extraído. Se consideraron como aceptables para su utilización aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 nm cercana a 2,0; y absorbancia 260/230 entre 1,8 y 2,2.

12.b Retrotranscripción (RT-PCR)

A partir de la concentración medida de ARN de cada muestra, se prepararon soluciones con 5µg de ARN en un volumen de 5 µl en agua en tubos *eppendorf* de 0,2 ml. Se adicionó 1 µl de una solución de *primer Random Hexamer* 50 µM a cada *eppendorf*, y las muestras fueron incubadas a 70°C durante 5 minutos en termobloque. A continuación, los tubos fueron transferidos a hielo durante 5 minutos adicionales.

Se agregaron 15 µl de una Mezcla de Reacción de RT-PCR a cada muestra, preparada según la siguiente tabla.

Componente	Volumen calculado para una muestra
Mezcla DNTs 10 mM (2,5 mM	1 µl
ATP, 2,5 mM TTP, 2,5 mM	
CTP, 2,5 mM GTP)	
Enzima RevertAid reverse	1 µl
transcriptase 200U/µl	
Buffer de la enzima 5X	4 μΙ
Agua estéril Roche	9 µl

Tabla 4. Composición de la Mezcla de Reacción de RT-PCR

Se llevó a cabo la reacción de RT-PCR en un termociclador INEVA T-18 con el siguiente programa:

- 1. 25 °C 5 segundos.
- 2. 42 °C 60 minutos.
- 3. 72 °C 10 minutos.

El cDNA obtenido luego de la reacción de RT-PCR fue utilizado en la reacción de PCR en tiempo real.

12.c PCR en tiempo real (qPCR)

La determinación del nivel de expresión de ARNm de MMP-9, Bax y Ciclina D1 se realizó mediante una reacción de *qPCR* con el reactivo fluorescente SYBR Green.

Para la reacción de *qPCR* se decidió utilizar 1 μ l de la reacción de RT-PCR, y se preparó la Mezcla de *primers* y la Mezcla de Reacción de *qPCR* según se indica en las Tablas 5 y 6 que se muestran a continuación.

<u>Mezcla de primers</u>: Se evaluaron diferentes cantidades de *primer Foward* (Fw)
 y *Reverse* (Rv) entre 0,25 a 1,0 μl de una solución de *primer* 10μM con el fin de encontrar
 la concentración óptima para la reacción de PCR.

Componente	Volumen por muestra
Primer Foward 10 µM	0,25 a 1,0 μl
Primer Reverse 10 µM	0,25 a 1,0 μl
Agua estéril	0 a 0,75 µl

Tabla 5. Componentes de la Mezcla de primers

- Mezcla de reacción de qPCR:

Para la reacción de qPCR propiamente dicha, se preparó una Mezcla de Reacción de qPCR con: la Mezcla de *primers*, el producto de reacción de RT-PCR, la enzima correspondiente y las soluciones que se detallan en la Tabla 6.

Componente	Volumen por muestra
Reacción de RT-PCR	1 µl
Mezcla DNTs 10 mM (2,5 mM ATP, 2,5 mM TTP, 2,5	0,5 µl
mM CTP, 2,5 mM GTP)	
Enzima <i>Taq DNA polymerase</i> 5U/ml	0,15 µl
<i>Buffer</i> de la enzima 10X	2,5 µl
MgCl₂ 50 mM	1 µl
SYBR <i>Green</i> dilución 1/300	0,25 µl
Mezcla de <i>primers</i>	2 µl
Agua estéril Roche	17,6 µl
Volumen final	25 µl

Tabla 6. Componentes de la Mezcla de reacción de qPCR

En la tabla 6 se detalla la secuencia nucleotídica de los *primers* utilizados y la temperatura de hibridización óptima determinada para cada par de *primers*, así como el tamaño esperado del amplicon y la longitud de cada *primer* en nucleótidos (nt). Para la determinación de la temperatura de hibridización óptima para cada par de *primers* se realizaron ensayos de qPCR con diferentes temperaturas de hibridización (Temp. H; 58°C, 60°C y 63°C).

ARNm	Secuencia primer (5´-3´)	Longitud	Tamaño	Temp.	Vol. Primer
blanco		primer	amplicon	Н.	
β-actina	Fw: TCATGAAGTGTGACGTGGACATCCG	<i>Fw</i> : 25 nt.	285 nt.	60° o	Fw: y Rv: 0,5
	Rv: CCTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATG	<i>Rv</i> : 26 nt.		63°C	μΙ
Bax	Fw: CATGGAGCTGCAGAGGATGAT	<i>Fw</i> : 21 nt	93 nt.	60°C	Fw: y Rv: 1,0
	Rv: TTGCCGTCAGAAAACATGTCA	<i>Rv</i> : 21 nt.			μΙ
MMP-9	Fw: ACGCACGACGTCTTCCAGTA	<i>Fw</i> : 20 nt	94 nt.	63°C	Fw: y Rv: 0,5
	Rv: CCACCTGGTTCAACTCACTCC	<i>Rv</i> : 21 nt.			μΙ

Tabla 7. *Primers* utilizados en reacciones de *qPCR*. Se muestra el nombre del ARNm blanco, la secuencia de los *primers*, su longitud, el tamaño esperado de amplicon, la temperatura óptima de hibridización y el volumen de *primers Fw* y Rv 10µM óptimo. Referencias: nt: nucleótidos.

La reacción de *qPCR* se llevó a cabo en el equipo BioRad MyIQ5 según el siguiente programa:

- 1. Iniciación: 94°C, 2 minutos
- 2. Desnaturalización: 92°C, 20 segundos
- 3. Hibridización: 60°C o 63°C, 20 segundos 40 ciclos
- 4. Elongación: 72°C, 30 segundos
- 5. Muestreo :adquisición fluorescencia láser 488

Al finalizar la reacción de qPCR, se realizó una Curva de Temperatura en el mismo termociclador. La Curva de Temperatura consistió en un aumento progresivo de la temperatura y en la medición de la intensidad de fluorescencia para cada reacción de qPCR individual. Se analizó la fluorescencia entre 60°C y 100°C en intervalos de 0,5 °C. En la Figura M.2 se graficó la derivada de la intensidad de fluorescencia ($\delta F/\delta T$) en función de la temperatura, luego de la optimización de la temperatura de hibridización para cada par de *primers* (actina, Bax, MMP-9 y Ciclina D1) y de la cantidad de muestra de reacción de RT-PCR. Los resultados revelan que, para las condiciones de reacción finalmente elegidas, hay un único máximo de la curva de temperatura, lo cual es indicativo de la existencia un único producto de qPCR en cada reacción.



Figura M.2: Gráfico de la derivada de la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura para los diferentes amplicones: β-actina, Bax y MMP-9.

Adicionalmente, se evaluó la longitud y el número de productos de qPCR por electroforesis en gel de agarosa con BrEt. Se contrastó el tamaño del producto de reacción con la longitud del amplicon esperado mediante el uso de un marcador de peso molecular para ADN. Tanto para β -actina como para MMP-9 se evaluaron los productos de reacción generados a partir de diferentes cantidades de reacción de RT-PCR (0; 0,5, 1 y 2 µl). MMP-9



Figura M.3: Evaluación de los productos de qPCR por electroforesis en gel de agarosa revelado con BrEt.

12.d. Cálculo de las veces de inducción de la expresión ARNm blanco respecto de actina y relativo a la condición control.

Los valores de intensidad de fluorescencia en función del número de ciclo fueron analizados con el *software* LinReg *PCR*. El número de ciclo correspondiente al umbral de fluorescencia (CT o threshold cycle) es inversamente proporcional a la cantidad de *cDNA* inicial en la mezcla de reacción. El número de CT, la eficiencia de amplificación y bondad del ajuste lineal (R²) fueron calculados con el *software* LinReg *PCR*.

Adicionalmente, se utilizaron distintas cantidades de muestra de la reacción de RT-*PCR* y se evaluó el CT obtenido en cada reacción. La relación entre el CT y volumen de *RT-PCR*, presentó una correspondencia lineal entre 0,2 y 3 µl de RT-PCR para los *primers* de β -actina y entre 0,5 y 3 µl para Bax, MMP-9 y Ciclina D1.

La expresión de ARNm de MMP-9, Bax y Ciclina D1 fue calculada como las veces de inducción de la expresión de estos ARNm, normalizada por la expresión del ARNm de β -actina, respecto al grupo transfectado con pCI-neo y tratado con PMA o TNF- α . Los valores de CT de tres réplicas para cada grupo y tratamiento fueron promediados para el análisis posterior. A partir de los valores promedio de CT, se determinó la inducción en la expresión del ARNm de MMP-9 y Bax con el método de dos delta CT ($\Delta\Delta$ CT), según la siguiente ecuación:

veces de inducción_{muestra} = $2^{-\Delta CT \text{ muestra} - \Delta CT \text{ TNF} - \alpha \text{ o PMA}}$

Las veces de inducción de la expresión de un gen blanco para una muestra de interés (veces de inducción _{muestra}), se calculó a partir de la diferencia de Δ CT entre la muestra de interés (Δ CT muestra) y la condición transfectada con el vector vacío y tratada con PMA o TNF- α (Δ CT PMA o TNF – α), según corresponda.

A su vez, el \triangle CT se obtiene a partir de la diferencia entre el CT correspondiente al gen blanco (CT_{gen blanco}) y el CT de β -actina (CT_{actina}). Al reemplazar el término \triangle CT de la primer ecuación, resulta que las veces de inducción de la expresión de un gen blanco para una muestra dada se pueden calcular como:

veces de inducción_{muestra} = $2^{-(CT \text{ gen blanco} - CT \text{ actina})}$ muestra - (CT gen blanco - CT actina) TNF- α o PMA

Los resultados de veces de inducción se promediaron entre experimentos independientes, y en cada caso se informó dicho promedio con su correspondiente error estándar.

13. Evaluación de la viabilidad celular con el ensayo de MTT

La viabilidad celular fue evaluada por el método reducción metabólica de MTT. La reducción de MTT catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa genera un producto coloreado, formazán. La aparición de formazán evidencia la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas.

Se estudió el efecto de FKBP51 sobre viabilidad celular luego del tratamiento con agentes inductores de muerte en células Hek293 FKBP51 o Hek293 WT. El análisis del efecto de FKBP52 sobre la muerte celular se realizó en células Hek293 WT transfectadas con el plásmido de expresión de FKBP52 o el vector pCI-neo. Se sembraron $5x10^5$ células por pocillo de placa *multiwell 96*. Las células fueron tratadas con cantidades crecientes de peróxido de hidrógeno (0 a 500 µM) o de estaurosporina (0 a 500 nM) durante 24 horas en medio DMEM sin suero. Posteriormente, se agregaron 5 µl una solución de MTT 5 mg/ml, la cual se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37°C 5% CO₂.

Transcurrido el tiempo anterior, el medio de cultivo fue removido, y el formazán producido fue solubilizado con el agregado de 200 µl de DMSO a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 562 nm (A₅₆₂) y a 630 nm (A₆₃₀) en un lector de microplaca RAYTO RT-6000. El valor de A₆₃₀ fue restado al obtenido para A₅₆₂. A las células Hek293 WT o Hek293 WT transfectadas con el vector pCI-neo, según corresponda, no tratadas con peróxido de hidrógeno o estaurosporina, se les asignó un valor de A₅₆₂ - A₆₃₀ igual a 100 % de viabilidad. Los valores viabilidad correspondientes a los grupos restantes y/o tratamientos fueron referidos a la condición anterior. La viabilidad celular para cada grupo fue graficada en función de concentración de peróxido de hidrógeno o de estaurosporina. Los resultados obtenidos fueron ajustados a una curva sigmoidea y el valor de LC50 (concentración letal media) fue calculado a partir del ajuste realizado con el software *GraphPad Prism* 6.

14. Ensayos de proliferación celular

14.a Recuento de células viables

El recuento de células viables se realizó con el colorante de exclusión vital, *Trypan Blue* y cámara de *Neubauer*.

Para los ensayos de proliferación con células Hek293 FKBP51 por recuento de células viables, se sembraron 2 x 10⁵ células por pocillo de placa de 30 mm. Se comparó el número de células viables luego de 96 horas post-siembra entre tres clones

independientes de Hek293 FKBP51, Hek293 WT y Hek293 pCI-neo. En cada experimento independiente, se sembraron las diferentes líneas celulares por duplicado. Las células fueron contadas en cámara de *Neubauer y se* asignó un valor de 100% de células viables al recuento resultante para la línea Hek293 WT. Los resultados de recuento celular del resto de las líneas celulares fueron relativizados al valor obtenido para Hek293 WT.

El efecto de FKBP52 sobre la proliferación celular se estudió mediante la sobreexpresión transitoria de esta FKBP o del vector vacío en células Hek293 WT. Se sembraron 2x10⁵ células por pocillo de placa de 30 mm y se transfectaron con 2µg de plásmido codificante para FKBP52, FKBP51 o el vector vacío. 96 horas post-transfección, las células fueron contadas en cámara de Neubauer. Se asignó un valor de 100% de células viables al grupo transfectado con el vector pCI-neo y los resultados correspondientes al resto de los grupos fue relativizado al grupo vector vacío.

14.b Ensayo de proliferación con la sonda CFSE.

La sonda Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) permite estudiar la división celular a lo largo del tiempo. La sonda CFSE es fluorescente y permeable a la membrana plasmática. Una vez en el interior de la célula, es transformada por esterasas intracelulares, a la vez que interactúa covalentemente con proteínas, y por lo tanto su salida al medio extracelular se ve desfavorecida. Con las sucesivas divisiones celulares, la sonda se segrega de forma equitativa a las células hijas. La fluorescencia de CFSE total disminuye acorde a la tasa de proliferación celular.

Se estudió la proliferación de la línea estable Hek293 FKBP51 respecto de su línea parental, Hek293 WT mediante la marcación con CFSE. Se resuspendieron 2,8 x 10⁶ células Hek293 WT o Hek293 FKBP51 en 3 ml PBS con una concentración final de CFSE 10 µM. Para la marcación, se ubicó el tubo *falcon* con las células en posición horizontal, y al mismo se agregaron 3,3 µl de una solución de CFSE 5 mM en DMSO a una gota de 330 µl de PBS. Inmediatamente se tapó e invirtió el tubo *falcon*, y las células fueron sometidas a *vortex* suave con el objetivo de obtener una marcación semejante en todas las células tratadas. Las células fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz con papel aluminio. La marcación fue detenida con 10 volúmenes de 10% de SFB en PBS. Las células fueron centrifugadas a 500 xg durante 5 minutos y el sobrenadante fue descartado. Los lavados con 10% SFB en PBS fueron

repetidos 3 veces. Finalizada la marcación, se sembraron 5 x 10⁵ células por pocillo de 30 mm.

Para el ensayo de proliferación con CFSE por microscopía de fluorescencia, se sembraron células sobre vidrios cubreobjeto previamente tratados con polilisina-D. Se incubaron los vidrios durante 16 horas y 96 horas a 37 °C y 5% CO₂. Las células cultivadas fueron fijadas con metanol a -20°C, y luego incubadas con DAPI durante 5 minutos para la detección de los núcleos celulares. Los vidrios fueron lavados 3 veces durante 5 minutos con PBS y luego montados sobre portaobjetos con mowiol. Las células marcadas fueron observadas en microscopio de epifluorescencia y la fluorescencia total por célula de CFSE fue cuantificada con el software *Image J*. Se asignó 100% de fluorescencia al promedio de fluorescencia de las células Hek293 pCI-neo y Hek293 FKBP51 cultivadas durante 16 horas con CFSE (fluorescencia inicial). La fluorescencia individual de las células cultivadas por 96 horas fue relativizada a la condición fluorescencia inicial. Se realizaron los controles correspondientes de auto-fluorescencia para ambas líneas celulares con células sin tratar con la sonda CFSE.

Para el análisis de división celular con la sonda CFSE por citometría de flujo, las células marcadas con la sonda fueron sembradas en placa de 6 pocillos y crecidas en incubadora a 37°C y 5% CO₂. Se levantaron las células con tripsina luego de 0, 48, 72 y 96 horas de marcación con CFSE. Las células fueron fijadas con 500 µl de PFA 4% durante 15 minutos y luego tratadas con solución de glicina 1% en PBS. Se realizó un lavado con PBS por centrifugación, y las células fueron resuspendidas en PBS y reservadas en heladera hasta el momento de la medición de fluorescencia. La fluorescencia fue determinada con el citómetro de flujo BD Acuri (Beckton-Dickinson, Mountain View), equipado con un láser 488-nm laser y un canal colector FL2 (585 nm) y el software ModFIT LT.

15. Análisis de la expresión génica con microarreglo.

15.a Preparación de muestras biológicas y extracción de ARN.

Se sembraron dos pocillos con 5 x 10⁵ células Hek293 FKBP51 y otros dos con Hek293 pCI-neo en una única placa de 6 pocillos con medio DMEM, antibiótico y 10% SFB. Se utilizaron células Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo de pasajes 62 a 67. Luego de 96 hs post-siembra, y sin ningún tipo de tratamiento excepcional, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 500 μl de Trizol. El experimento fue repetido una semana después, y las muestras obtenidas en ambas oportunidades fueron utilizadas en el ensayo de microarreglo. Todas las células en Trizol fueron reservadas en freezer a - 80°C hasta su utilización. Las muestras fueron enviadas al Instituto Pasteur de Montevideo donde se realizó el ensayo de microarreglo propiamente dicho.

El ARN total fue obtenido según el protocolo sugerido por el fabricante de Trizol. La concentración e integridad del ARN extraído (RIN, *RNA Integrity Number*) fue determinada con el equipo *Bioanalizer* 2100, Agilent. Todas las muestras analizadas mostraron buena integridad del ARN analizado con un RIN superior a 9, según se muestra en la Tabla M.8.

Línea celular	número de pasaje	Concentración RNA (ng/µl)	RIN	Posición en slide
Hek293 FKBP51	67	962	9.1	1_3
Hek293 FKBP51	62	705	9	2_1
Hek293 FKBP51	68	695	9.2	1_4
Hek293 FKBP51	63	1,208	9.1	1_2
Hek293 pCI-neo	65	715	9.2	2_3
Hek293 pCI-neo	63	804	9.3	2_2
Hek293 pCI-neo	66	904	9.1	1_1
Hek293 pCI-neo	64	1,211	9.2	2_4

Tabla M.8. Detalle de las muestras utilizadas en el ensayo de microarreglo de expresión, donde se especifica el número de pasaje de las células, la concentración del RNA obtenida, el RIN (RNA Integrity Number) y su ubicación sobre el slide.

15.b Microarreglo de expresión

Para el análisis de la expresión diferencial entre las líneas celulares Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo se utilizó el microarreglo de expresión de un color SurePrint G3 Human GE v2 8x60K de 8 muestras con cobertura de 60.000 sondas, número de diseño 039494 (Agilent). Se evaluó la expresión génica diferencial entre las dos condiciones ensayadas: células Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo sin ningún tratamiento adicional, crecidas en condiciones estándar de cultivo celular.

Acorde a lo especificado por el fabricante, el ARN fue retrotranscripto a cDNA. El cDNA fue marcado con el fluorósforo Cy3 y el kit Low Input Quick Amp Labeling, one-color (Agilent) según indicaciones del fabricante. La hibridación y los lavados

correspondientes realizados sobre el slide, así como los controles de calidad con Agilent Feature Extraction (versión 9.5.1) fueron hechos según el protocolo especificado el proveedor. El slide fue leído con Agilent Microarray scaner G2565BA. Las muestras fueron dispuestas en el slide según se indica en la Tabla M.8 y la referencia de cada posición se muestra en la Figura M.4.



Figura M.4. Imagen obtenida del ensayo de microarreglo con baja magnificación. Cada rectángulo corresponde a un chip individual donde fue hibridada la muestra indicada en la Tabla M.8 según la posición que se muestra en esta figura.

15.c Análisis estadístico del microarreglo de expresión.

El análisis estadístico de los datos obtenidos del microarreglo fue realizado con la herramienta BRB array tools (NIH). Se obtuvieron los valores correspondientes al logaritmo de la intensidad de fluorescencia para cada sonda del microarreglo. La medición fue realizada por el servicio de microarreglos del Instituto Pasteur de Montevideo a cargo del Dr. Carlos Robello. A partir de los resultados obtenidos, se realizó el análisis estadístico en nuestro laboratorio. Los indicadores correspondientes a cada sonda del arreglo fueron anotados con BRB array tools a partir del diseño del *slide* disponible en el sitio web de Quiagen y con bases de datos de libre acceso. Es decir, a cada identificador único le fue asignado un símbolo de gen, un nombre, un *accession number* de NCBI y/o un identificador de EnsEMBL. Se aplicó un filtro de detección de

fluorescencia con un umbral de intensidad mínima igual a 5 U.A. y se promedió la intensidad correspondiente a los spots replicados en el slide. Los valores fueron normalizados también por el método de cuantiles, y los genes fueron filtrados según las veces inducción de su expresión entre ambas condiciones o clases (Fold change \geq 1,5; o fold change \leq 0,5). De los 62977 identificadores contenidos en el arreglo, incluyendo controles internos, 8185 fueron recuperados luego de la aplicación de los filtros y normalizaciones. Se definieron dos clases experimentales, Hek293 FKBP51 (clase 1) y Hek293 pCI-neo (clase 2), que fueron comparadas con la función "class comparison" de BRB array tools. La comparación elegida consistió en un test t de student con modelo de varianza aleatoria (parámetros del modelo de varianza, a= 1,3011, b= 12,19222, estadístico Kolmogorov-Smirnov = 0,03516). Con un nivel de significancia para cada test de variable única de p≤0,005 se obtuvieron 571 genes con expresión diferencial entre ambas clases. 272 genes expresados diferencialmente entre Hek293 pCI-neo y Hek293 FKBP51 fueron recuperados con el mismo test con p≤0,001. Los resultados de la comparación de clases (p≤0.005) fueron exportados para el análisis de vías de señalización canónica, funciones biológicas y enfermedades asociadas a la expresión diferencial determinada para los genes obtenidos experimentalmente con el software Ingenuity Pathways (Quiagen).

Los factores de transcripción capaces de regular la transcripción de los genes con expresión diferencial entre Hek293 pCI-neo y Hek293 FKBP51 fueron predichos con la herramienta BRB array tools. Brevemente, BRB array tools compara los datos experimentales del microarreglo con listas de genes de la base de datos curada Transcriptional Regulator Element Database (TRED). Se utilizaron diferentes test estadísticos: test de permutación por cuadrados mínimos (LS) y por Kolmogorov-Smirnov (KS), test de máximas medias Efron-Tibshirani GSA (p≤0,005) para realizar la predicción de los factores de transcripción involucrados en los datos experimentales.

Los genes con expresión diferencial entre ambas clases fueron agrupados en clusters y ordenados según agrupamiento jerárquico por distancia euclideana. El nivel de expresión de cada gen se presenta por muestra individual según un gradiente de color verde.

16. Análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la proteína p65 humana.

Las secuencias aminoacídicas fueron obtenidas a partir de la base de datos *Protein* de NCBI. Para la selección de las secuencias homólogas se utilizó como criterio el porcentaje de identidad de secuencia respecto a la isoforma 1 de p65 humana. Se recuperaron 35 secuencias disponibles, entre las que se incluyeron 23 proteínas de mamíferos (primates, caninos, felinos, mamíferos acuáticos, roedores voladores y roedores terrestres), 2 especies de peces, 1 reptil, 1 anfibio, 2 aves y 1 invertebrado. Se excluyeron de las secuencias recuperadas aquellas que fueron nombradas a partir de otros miembros de la familia Rel A, como NFAT, c-Rel, p100, entre otras. La secuencia disponible perteneciente a un invertebrado corresponde a la proteína dorsal de *Drosophila melanogaster*, ampliamente reconocida como equivalente a NF- κ B en invertebrados (104).

En la Tabla M.9 se presentan los datos correspondientes a las secuencias utilizadas.

Nom	bre especie	Nombre común	Clasificación	Identificador	
1.	1. Homo sapiens	Humano	Mamífero, orden Primate	NP_068810.3	
2. miss	Alligator sissippiensis	Caimán del misisipi	Reptil	XP_019350728.1	
3.	Aotus nancymaae	Mono nocturno	Mamífero, orden Primate	XP_012318394.1	
4. bact	Camelus rianus	Camello	Mamífero, orden Artiodactyla	XP_010955442.1	
5. fami	Canis lupus liaris	Perro doméstico	Mamífero, orden Carnivora	XP_540850.2	
6.	Castor canadensis	Castor americano	Mamífero, orden Rodentia	XP_020020480.1	
7.	Cercocebus atys	Mangabey gris	Mamífero, orden Primate	XP_011897055.1	
8. Cervus elaphus hippelaphus		Ciervo rojo común	Mamífero, orden Artiodactyla	OWK17594.1	
9. japo	Coturnix nica	Codorniz japonesa	Ave	XP_015706422.1	
10). Danio rerio	Pez cebra	Pez	NP_001001839.2	
11 leuc	. Delphinapterus as	Beluga	Mamífero, orden Cetacea	XP_022447166.1	
12. Desmodus rotundus		Vampiro de azara	Mamífero, orden Dermoptera	XP_024430030.1	
13. Drosophila melanogaster		Mosca de fruta	Invertebrado	NP_724052.1	
14 keny	. Enhydra lutris ⁄oni	Nutria marina	Mamífero, orden Rodentia	XP_022362935.1	
15	5. Equus caballus	Caballo	Mamífero, orden Artiodactyla	XP_023510230.1	
16	5. Felis catus	Gato doméstico	Mamífero, oden Carnivora	XP_023095836.1	
17 varie	7. Galeopterus egatus	Lemur malayo volador	Mamífero, orden Dermoptera	XP_008576943.1	

18. dome	Lonchura striata estica	Capuchino del Japón	Ave	XP_021401412.1
19. africa	Loxodonta ana	Elefante africano	Mamífero, orden Proboscidea	XP_023415352.1
20. fasci	Macaca cularis	Macaco cangrejero	Mamífero, orden Primate	BAE87977.1
21.	Manis javanica	Pangolin malayo	Mamífero, orden Pholidota	XP_017515649.1
22. murii	Microcebus nus	Lémur ratón gris	Mamífero, orden Primate	XP_012633553.1
23. virgir	Odocoileus nianus texanus	Ciervo de cola blanca	Mamífero, orden Artiodactyla	XP_020762118.1
24. kisut	Oncorhynchus ch	Salmón del Pacífico	Pez	XP_020359926.1
25. anati	Ornithorhynchus nus	Ornitorrinco	Mamífero, orden Monotremata	XP_001506224.4
26. afer	Orycteropus afer	Cerdo hormiguero	Mamífero, orden Tubulidentata	XP_007943155.1
26. afer 27. forme	Orycteropus afer Scleropages osus	Cerdo hormiguero Pez lengüihueso malayo	Mamífero, orden Tubulidentata Pez	XP_007943155.1 XP_018607644.1
26. afer 27. forme 28.	Orycteropus afer Scleropages osus Sus scrofa	Cerdo hormiguero Pez lengüihueso malayo Jabalí	Mamífero, orden Tubulidentata Pez Mamífero, orden Artiodactyla	XP_007943155.1 XP_018607644.1 NP_001107753.1
26. afer 27. forme 28. 29. tropie	Orycteropus afer Scleropages osus Sus scrofa Xenopus calis	Cerdo hormiguero Pez lengüihueso malayo Jabalí Rana	Mamífero, orden Tubulidentata Pez Mamífero, orden Artiodactyla Anfibio	XP_007943155.1 XP_018607644.1 NP_001107753.1 NP_001001211.1
26. afer 27. forme 28. 29. tropie 30. garne	Orycteropus afer Scleropages osus Sus scrofa Xenopus calis Otolemur ettii	Cerdo hormiguero Pez lengüihueso malayo Jabalí Rana Gálago de Garnet	Mamífero, TubulidentataordenPezMamífero, orden ArtiodactylaAnfibioMamífero, orden Primate	XP_007943155.1 XP_018607644.1 NP_001107753.1 NP_001001211.1 XP_003798713.1
26. afer 27. formo 28. 29. tropio 30. garne 31. tephr	Orycteropus afer Scleropages osus Sus scrofa Xenopus calis Otolemur ettii Piliocolobus rosceles	Cerdo hormiguero Pez lengüihueso malayo Jabalí Rana Gálago de Garnet Colobo rojo ugandés	Mamífero, orden Tubulidentata Pez Mamífero, orden Artiodactyla Anfibio Mamífero, orden Primate Mamífero, orden Primate	XP_007943155.1 XP_018607644.1 NP_001107753.1 NP_001001211.1 XP_003798713.1 XP_023042293.1
26. afer 27. formo 28. 29. tropio 30. garne 31. tephr 32. norve	Orycteropus afer Scleropages osus Sus scrofa Xenopus calis Otolemur ettii Piliocolobus rosceles Rattus egicus	Cerdo hormiguero Pez lengüihueso malayo Jabalí Rana Gálago de Garnet Colobo rojo ugandés Rata parda	Mamífero, Tubulidentataorden TubulidentataPezImamífero, orden ArtiodactylaMamífero, orden PrimateMamífero, orden PrimateMamífero, orden Rodentia	XP_007943155.1 XP_018607644.1 NP_001107753.1 NP_001001211.1 XP_003798713.1 XP_023042293.1 NP_954888.1

Tabla M.9. Detalle de las secuencias aminoacídicas utilizadas en el alineamiento de secuencias. Se muestra el nombre científico de la especie, el nombre común y el identificador (accession number NCBI).

El alineamiento de secuencias fue realizado con la herramienta de alineamiento múltiple de secuencias de EMBL-EBI, Clustal Omega. Se utilizó como referencia a la secuencia aminoacídica de la isoforma 1 de p65 humana (NP_068810.3). Los resultados del alineamiento múltiple obtenido se presentan a continuación.

Referencias: cov (porcentaje de cobertura respecto a secuencia de referencia), pid (porcentaje de identidad de secuencia respecto a la secuencia de referencia)

Reference sequence : Homo sapiens Identities normalised by aligned length. Colored by: identity

cov

pid

. 80

1	Homo	100.0%	100.0%	
2	Alligator	95.8%	49.2%	SHPCGSHPCG
3	Aotus	92.9%	96.3%	
4	Camelus	97.5%	87.3%	
5	Canis	96.6%	88.2%	
6	Castor	97.6%	84.1%	
7	Cercocebus	99.8%	98.2%	
8	Cervus	98.5%	87.1%	
9	Coturnix	59.2%	55.8%	
10	Danio	75.9%	45.7%	
11	Delphinapterus	97.5%	85.4%	
12	Desmodus	97.3%	86.7%	
13	Drosophila	92.2%	23.3%	
14	Enhydra	95.5%	86.1%	
15	Equus	97.5%	87.6%	
16	Felis	97.8%	89.1%	
17	Galeopterus	98.2%	71.7%	MRROPGADGAPAAVPTPTAHGLALGSALALIIAPGAGGROFGRILSGRFSGRGDEPRPCSKLREAPRSKHCOETRVEFSP
18	Lonchura	78.0%	46.1%	
19	Loxodonta	100.0%	84.9%	
20	Macaca	99.5%	98.2%	
21	Manis	97.3%	85.6%	
22	Microcebus	99.6%	92.2%	
23	Odocoileus	98.5%	86.9%	
24	Oncorhynchus	88.7%	37.4%	
25	Ornithorhynchus	48.1%	78.4%	
26	Orycteropus	98.0%	90.1%	
27	Otolemur	99.6%	92.2%	
28	Pan	100.0%	99.8%	
29	Physeter	97.5%	81.4%	
30	Piliocolobus	100.0%	98.7%	
31	Rattus	99.1%	88.8%	
32	Rhinopithecus	100.0%	98.4%	
33	Scleropages	94.9%	37.8%	
34	Sus	97.5%	87.1%	
35	Xenopus	91.8%	49.0%	
	consensus/100%			
	consensus/90%			
	consensus/80%			
	consensus/70%			

cov pid 81		1			•		:	. 160		
Numeración de pro	linas (p	65 humana)							6 10	כ
Encabezado especi	e									
1 Homo	100.0%	100.0%						;	MDELFPLIFI	PA-D
2 Alligator	95.8%	49.2%		;	AAHGGEWVPY-	MDTGGA-0	GTPPATE	RSLTSSCLCL	LPDLLPLLLC	PDWHM
3 Aotus	92.9%	96.3%								
4 Camelus	97.5%	87.3%						;	MODLFPLIF	PA-
5 Canis	96.6%	88.2%						;	MODLFPLIF	PA-
6 Castor	97.6%	84.1%		MAA	LGSAGPWREPP	PRCLLP	PFC	CAARCCAGSGR	PDLFPLIF	PSA
7 Cercocebus	99.8%	98.2%							MDELFPLIF	PA-
8 Cervus	98.5%	87.1%							M DLFPLIFI	PA-D
9 Coturnix	59.2%	55.8%								
10 Danio	75 9%	45 7%								THOWGTS
11 Delphinapterus	97 58	85.48					N	WACADDCT.T.T.	TSDIFDITE	
12 Desmodus	97.38	86.7%						MACADICIIII	LODIFFITFI	S-
12 Desmodus	02.2%	222.78			MED				VNCI DAOOO	
14 Debudue	92.23 OF F0	23.35			ME P		SQGPAVDGÇ	2Q5ши	INGLPAQQQQ	QLAQSI
14 Ennyara	93.38	80.13							M DLFPLIFF	25-
15 Equus	97.58	87.68							WEDTLATLE	2S-
16 Felis	97.8%	89.1%							M DLFPLIFE	PT-≥
17 Galeopterus	98.2%	/1./%	PILAGAAGSGLSL	RSAADRSLAALA	VVQSGPRGAGP	ASVSLGGRTH	RALPGEDGF	WAWADPCLPP	FSDLFPLIFE	PS-⊇
18 Lonchura	78.0%	46.1%								
19 Loxodonta	100.0%	84.9%					MGSRGWI	TVAYADSWPPR	LPDLFPLIF	PS-≥
20 Macaca	99.5%	98.2%							MOSLFPLIF	PA- ≥
21 Manis	97.3%	85.6%					MS#	AGSAKPTVRA	LPDLFPLIF	₽Т-≥
22 Microcebus	99.6%	92.2%							MDLFPLIF	PS-⊵
23 Odocoileus	98.5%	86.9%							MDLFPLIF	PA- ≥
24 Oncorhynchus	88.7%	37.4%								
25 Ornithorhynchu	s 48.1%	78.4%								
26 Orycteropus	98.0%	90.1%							MEDLFPLIF	PS-≥
27 Otolemur	99.6%	92.2%						;	MODLFPLIF	PS-D
28 Pan	100.0%	99.8%						;	MDELFPLIF	PA-
29 Physeter	97.5%	81.4%							M DLFPLIF	PA- D
30 Piliocolobus	100.0%	98.7%							MDELFPLIF	PA-
31 Battus	99 1%	88 8%							MDLFPLTFI	PS-D
32 Rhinopithecus	100 0%	98.4%							MORIFPLIT	A-
33 Scleropages	9/ 9%	37.8%				M	F-		K VMMTVKH	CMYSWC
SA Sue	97 58	87 18					· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	QF 11	MDLEDLIEI	DS-
35 Venopus	97.53	19 08							MEGELDSI	
conconcus/100%	91.03	49.03							MEGE LESTMI	LDPIVSST
consensus/100%						•••••				• • • • • • •
consensus/90%						•••••				
consensus/80%				• • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •	•••••		• • • • • • • • • • • •	n.tnns.hh.	s.p
consensus/70%			•••••	• • • • • • • • • • • • •		•••••			hs-LFPLIFI	Pu.
	CO17	nid 16	1			2				2
Numeración de pro	linae (n	65 humars	13 19	. 27		2	59	•	•	. 2
1 Homo	100 0%	100.0%		DK DCMDEDVE	4/					
1 1101110	100.08	100.02	FA ASGPIV II	FR RGPIRERIK	C GROAGSIPG	ASI TINTI	TELTV			

2	Alligator	95.8%	49.2%	PVPSSTPFV=II=OPKORGMRFRYKC=GRSAGSIPG=RST=ATKTHPTIK	
3	Aotus	92.9%	96.3%	MRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
4	Camelus	97.5%	87.3%	PA ASGPYV II P PK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
5	Canis	96.68	88.2%	PA ASGPYV II OPK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
7	Carcocebus	97.03	04.13	PA ASGPIVIII OK AGMERATAC GASAGSIPG ASI IIAINPIIA	
8	Cervus	98.5%	87.1%	PA ASGPYV II OPK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
9	Coturnix	59.2%	55.8%	PAVGPAPYV IL PK RGMRFRYKC GRSAGSIPG HST SARTHPTIR	
10	Danio	75.9%	45.7%	QVPQGPPHV:II:: PKSRGMRFRYKC: GRSAGSIPG:KSN:TTKTHPAIR	
11	Delphinapterus	97.5%	85.4%	PA ^ ASGPYV = II = ^ PK ^ RGMRFRYKC - GRSAGSIPG * RST = TTKTHPTIK	
12	Desmodus	97.3%	86.7%	PA ASGPYV II CPK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
13	Drosophila	92.2%	23.3%	KNVRKKPYVKIT: PAGKALRFRYEC: GRSAGSIPGVNSTPENKTYPTIE	
14	Enhydra	95.5%	86.1%	PA ASGPYV II PK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
15	Equus	97.5%	8/.6%	PA ASGPYV II OPK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
17	Galeonterus	97.03	09.⊥5 71 7&	PA ASGPIVIIS PA REMERTING GRAAGSIPG RSI IININPIIN-	
18	Lonchura	78 0%	46 1%		
19	Loxodont.a	100.0%	84.9%	PA ATGPYV II : PK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
20	Macaca	99.5%	98.2%	PA ASGPYV II PK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
21	Manis	97.3%	85.6%	PA ASGPYV II OFK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
22	Microcebus	99.6%	92.2%	PA VSGPYV II OPK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
23	Odocoileus	98.5%	86.9%	PA ASGPYV II : OPK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
24	Oncorhynchus	88.7%	37.4%	MRFRYKC GRSAGSTPG KSN TTKTHPAIK	
25	Ornithorhynchus	48.1%	78.4%	HSVNATD	
26	Orycteropus	98.0%	90.1%	PP ASGPYV II OPK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
27	Otolemur	99.6%	92.28	PA ASGPYV II PK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
28	Pan	100.0%	99.8%	PA ASGPYV II PK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
29	Physeter	97.5%	81.4%	PA ASGPIV II PK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIKVSTAPGWGTQSPYGRDLRSGPHSLCLGGGS	
3U 21	Pillocolobus	100.0% 00.1º	90./%	PA ASGYIVIII VK KGMKFKIKC GKSAGSIPG KST TTKTHPTIK	
20	Rattus	99.18 100 00	00.03	PA ABGEIVIII PA KGMKEKINU GKSAGSIEG KST TTKTHETIK	
32	Scleropages	Q/ 0%	37 99	PA ABGEIVIII PA KGMKEKINU GKAAGAIFG KAT TIKIHFIIK	
33	Sus	97 58	87 1%	PAPASCPYVEITEC PK RCMRFRYKC CRSACSIDC RCM TTKTHPAIK	
35	Xenopus	91.8%	49.0%	VMPSSHPHY II OK RGMRFRYKC GRSAGSIPG RST TTKTHPTIK	
	consensus/100%				
	consensus/90%				
	consensus/80%			ss.susPYV [®] II [®] PK [®] RGMRFRYKC [®] GRSAGSIPG [®] RST [®] TTKTHPTIK	
	consensus/70%			PApuSGPYV®II®OPKORGMRFRYKC=GRSAGSIPG®RST®TKKHPTIK	
		cov	pid 241		320
Nur	meración de proli	inas (p6	5 humana)	69 81,82,85,87 106	
1	Homo	100.0%	100.0%	I\GYTGPGTVRISLVTK`PPHRPHPH`LVGK-`CR`GFY`A`LCP`RCIHSF()`LGI(CVKKR`L`	
2	Alligator	95.8%	49.2%	I NYTGPGKIRISLVTK APYRPHPH LVGK- CK GYY A LAPERNIHSF LGI CVKKREL	
3	Aotus	92.9%	96.3%	I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L	
4	Camelus	97.5%	8/.3%		
5	Canis	96.68	88.28	I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCHSF LGI CVKKR L	
7	Carcocobus	27.03	04.10		
8	Cervus	99.0%	90.2% 87 1%		
9	Coturnix	59.2%	55.8%	V HYRCPGRVRVSLVTK PPHRPHPH LVGR-HCOHGYY A LSPERSUHSF LGT CVKKREL	
10	Danio	75.9%	45.7%	VHNYSGPVRVRISLVTKNOPYKPHPH LVGK- CKHGYY ADLO-ERRIHSF LGI CVKKK VG	
11	Delphinapterus	97.5%	85.4%	I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L	
12	Desmodus		0 (70	I ©YTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GYY A LCP RCIHSF NLGI CVKKR L	
13	Drosophila	97.3%	80./8		
14	<u>-</u> -	97.3% 92.2%	23.3%	IVGYKGRAVVVVSCVTK°TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL°INSETMRAVFS°LGI°CVKKK°I°	
15	Enhydra	97.3% 92.2% 95.5%	86.1% 86.1%	IVGYKGRAVVVVSCVTK©TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL=INSETMRAVFS%LGI©CVKKK©I© I%GYTGPGTVRISLVTK©PPHRPHPH=LVGK=©CR=GFY=A=LCP=RCIHSF%LGI©CVKKR©L©	
	Enhydra Equus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5%	86.78 23.38 86.18 87.68	IVGYKGRAVVVVSCVTK©TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL©INSETMRAVFS%LGI©CVKKK©I© I%GYTGPGTVRISLVTK©PPHRPHPH=LVGK=©CR©GFY®ALCP©RCIHSF©%LGI©CVKKR©L© I%GYTGPGTVRISLVTK©PPHRPHPH=LVGK=©CR©GFY®ALCP©RCIHSF©%LGI©CVKKR©L	
16	Enhydra Equus Felis	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8%	86.78 23.38 86.18 87.68 89.18	IVGYKGRAVVVVSCVTK®TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL®INSETMRAVFS%LGI©CVKKK®I I%GYTGPGTVRISLVTK®PPHRPHPH=LVGK=©CR®GFY%ALCP®RCIHSF%LGI©CVKKR®L I%GYTGPGTVRISLVTK®PPHRPHPH=LVGK=©CR®GFY%ALCP®RCIHSF%LGI©CVKKR®L I%GYTGPGTVRISLVTK®PPHRPHPH=LVGK=©CR®GFY%ALCP®RCIHSF%LGI©CVKKR®L	
16 17	Enhydra Equus Felis Galeopterus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2%	86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7%	IVGYKGRAVVVVSCVTK TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL INSETMRAVFS LGI CVKKK I I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L	
16 17 18	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0%	86.78 23.38 86.18 87.68 89.18 71.78 46.18		
16 17 18 19	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0%	80.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9%	IVGYKGRAVVVVSCVTK TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL INSETMRAVFS LGI CVKKK I IGTTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L IGTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L IGTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L 	
16 17 18 19 20 21	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 97.3%	80.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6%	IVGYKGRAVVVVSCVTK TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL INSETMRAVFS LGI CVKKK I I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCHSF LGI CVKKR L 	
16 17 18 19 20 21 22	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6%	86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2%	IVGYKGRAVVVVSCVTK TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL INSETMRAVFS LGI CVKKK I I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L 	
16 17 18 19 20 21 22 23	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 98.5%	80.78 23.38 86.18 87.68 89.18 71.78 46.18 84.98 98.28 85.68 92.28 85.68 92.28 86.98	IVGYKGRAVVVVSCVTK TPYRPHPHNLVGKEGCKKGVCTL INSETMRAVFS LGI CVKKK I I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L I GYTGPGTVRISLVTK PPHRPHPH LVGK- CR GFY A LCP RCIHSF LGI CVKKR L 	
16 17 18 19 20 21 22 23 24	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 98.5% 88.7%	36.1% 23.3% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4%		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 98.5% 88.7% 48.1%	20.78 23.38 86.18 87.68 89.18 71.78 46.18 84.98 98.28 85.68 92.28 86.98 37.48 78.48		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 99.5% 97.3% 99.6% 98.5% 88.7% 48.1% 98.0%	20.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 24.1% 25.6% 25.6% 22.2% 86.9% 37.4% 78.4% 90.1%		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 97.3% 98.5% 88.7% 48.1% 98.6% 99.6%	360.78 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 24.18 25.28 25.28 25.28 37.48 78.48 90.18 92.28		
16 17 18 20 21 22 23 24 25 26 27 28	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Otolemur Pan	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.5% 98.2% 98.2% 99.5% 99.5% 99.5% 99.6% 98.5% 88.7% 48.1% 98.0% 99.6% 100.0%	360.78 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 26.18 87.68 98.28 85.68 92.28 86.98 37.48 78.48 92.28 99.88		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 98.5% 88.7% 48.1% 98.0% 99.6% 100.0% 99.5%	360.78 23.38 23.38 23.38 23.38 22.38 86.18 71.78 46.18 84.98 98.28 85.68 92.28 86.98 37.48 78.48 90.18 92.28 99.88 81.48		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 88.7% 48.1% 98.0% 99.6% 99.6% 99.6% 100.0%	300.78 23.38 23.38 23.38 23.38 86.18 71.78 46.18 84.98 98.28 85.68 92.28 86.98 37.48 78.48 90.18 92.28 81.48 98.78		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Odocoileus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.5% 98.2% 100.0% 99.6% 99.6% 98.5% 48.1% 99.6% 99.6% 100.0% 99.6% 97.5% 100.0% 99.1%	20.78 23.38 24.28 90.18 92.28 93.78 81.48 98.78 88.88		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornchynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 97.3% 99.5% 97.3% 99.6% 98.5% 88.7% 48.1% 99.6% 100.0% 97.5% 99.6% 100.0%	23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 24.1% 25.2% 86.9% 37.4% 92.2% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.4%		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.5% 98.2% 97.3% 99.5% 99.6% 98.5% 88.7% 48.1% 99.6% 100.0% 97.5% 100.0% 97.5%	23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 24.1% 27.4% 28.4% 27.4% 28.8% 98.4% 37.8%		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus	97.3% 92.2% 95.5% 97.8% 98.2% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 99.6% 100.0% 99.6% 100.0% 97.5% 100.0% 99.1% 100.0% 99.1%	23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 86.18 71.78 46.18 84.98 98.28 85.68 92.28 93.48 94.48 92.28 99.88 81.48 98.78 88.88 98.48 37.88 87.18		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus	97.3% 92.2% 95.5% 97.8% 98.2% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 99.6% 100.0% 99.6% 100.0% 97.5% 100.0% 99.1% 100.0% 94.9% 97.5% 91.8%	20.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 86.18 71.78 46.18 84.98 98.28 85.68 92.28 86.98 37.48 78.48 90.18 92.28 98.78 88.88 98.78 88.84 93.78 88.84 97.18 97.18 97.08		
16 17 18 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Odocoileus Odocoileus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Physeter Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100%	97.3% 92.2% 95.5% 97.8% 98.2% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 88.7% 48.1% 98.0% 99.6% 100.0% 97.5% 100.0% 99.1% 100.0% 99.1% 100.0% 94.9% 94.9% 91.8%	20.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 24.18 90.18 90.18 90.18 90.18 90.18 92.28 93.78 81.48 98.78 98.48 37.88 87.18 49.08		
16 17 18 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Odocoileus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/90%	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 97.3% 99.5% 97.3% 99.5% 88.7% 98.5% 88.7% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.5% 99.8% 97.5%	20.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 24.1% 25.6% 22.2% 90.1% 92.2% 90.1% 92.2% 90.1% 92.2% 90.1% 92.2% 99.8% 81.4% 98.4% 37.8% 87.1% 49.0%		
16 17 18 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Odocoileus Odocoileus Oncorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/90%	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.5% 98.2% 97.3% 99.6% 99.5% 98.0% 98.6% 88.7% 48.1% 99.6% 100.0% 97.5% 99.1% 100.0% 94.9% 91.8%	360.78 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 23.38 86.18 87.68 98.28 85.68 92.28 86.98 37.48 92.28 99.88 81.48 98.78 88.88 98.48 37.88 87.18 49.08		
16 17 18 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 23 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/80% consensus/70%	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 98.5% 88.7% 48.1% 99.6% 100.0% 97.5% 99.1% 100.0% 94.9% 97.5% 91.8%	23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 24.1% 27.4% 28.2% 29.2% 37.4% 78.4% 90.1% 92.2% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.4% 37.8% 87.1% 49.0%		
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 23 33 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/90%	97.3% 92.2% 95.5% 97.8% 98.2% 98.2% 98.2% 99.5% 97.3% 99.5% 99.6% 98.5% 88.7% 48.1% 99.6% 100.0% 97.5% 100.0% 99.1% 100.0% 94.9% 97.5% 91.8%	<pre>ce. 7% 23.3% 23.3% 23.3% 23.3% 24.1% 25.6% 25.6% 25.6% 25.2% 25.6% 25.2% 25.6% 25.2% 25.4% 27.4% 26.9% 37.4% 26.9% 37.4% 27.8% 27.1% 28.8% 28.4% 37.8% 28.7% 28.2% 28.4% 27.8% 28.7% 28.2% 28.4% 27.8% 28.7% 28.2%</pre>		400
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/90%	97.3% 92.2% 95.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 99.6% 100.0% 97.5% 100.0% 99.1% 100.0% 99.1% 100.0% 99.18%	20.3% 23.3% 23.3% 25.3% 20.3% 20.3% 20.3% 20.4%		400
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Odocoileus Odocoileus Odocoileus Oncorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/80% consensus/70%	97.3% 92.2% 95.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 97.3% 99.6% 99.6% 100.0% 99.7% 100.0% 99.1% 100.0% 94.9% 97.5% 91.8%	20.78 23.38 23.38 25.38 20.18 27.68 89.18 27.78 46.18 84.98 98.28 85.68 92.28 85.68 92.28 85.68 92.28 85.68 92.28 85.68 92.28 90.18 92.28 90.18 92.28 90.18 92.28 93.88 81.48 98.78 88.88 98.48 37.88 87.18 49.08		400
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 Num 1 2	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/90% consensus/90% consensus/70%	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.5% 97.8% 98.2% 97.3% 99.5% 97.3% 99.5% 88.7% 48.1% 98.0% 99.6% 100.0% 97.5% 99.1% 100.0% 94.9% 97.5% 91.8%	20.3% 23.3% 23.3% 23.3% 20.3% 20.1% 20.1% 20.2% 22.2% 20.2% 20.2% 20.2% 20.2% 20.2% 20.1% 20.2% 20.1% 20.2% 20.1% 20.2% 20.1% 20.2% 20.4%		400
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 Num 1 2 3	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/90% consensus/80% consensus/70%	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.5% 97.8% 98.2% 99.6% 99.5% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 100.0% 97.5% 99.6% 100.0% 97.5% 99.1% 100.0% 94.9% 97.5% 91.8% 91.8%	<pre>>colorsymbol{321} >colorsymbol{321} >colors</pre>		400
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Odocoileus Oncorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100% consensus/80% consensus/80% consensus/70%	97.3% 92.2% 95.5% 97.5% 97.8% 98.2% 97.3% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 100.0% 97.5% 99.1% 100.0% 94.9% 97.5% 91.8%	20.3% 23.3% 23.3% 23.3% 20.3% 20.3% 20.3% 20.3% 20.2% 20.2% 20.2% 20.2% 20.2% 20.2% 20.2% 20.2% 20.3% 20.2% 20.3%		400

6	Castor	97.6%	84.1%	QAIS ORI OTNIN PFOVPIBLE RGOYOL AVRLCFOVTVROPSGRPLRLPPVLSHPIFON RAPNTAOLKICRV ROS
7	Cercocebus	99.8%	98.2%	_AIT_RI_TNNN PF_VPIBEORG_Y_LNAVRLCF_VTVR=PSGRPLRLPPVLSHPIF=NRAPNTA=LKICRV/R\S
8	Cervus	98.5%	87.1%	AIS RI TINN PF VPI BE RG Y LNAVRLCF VTVR PAGRPLRLVPVLSHPIF RAP TA LKICRV R S
10	Coturnix	59.2%	55.8%	AAVAERIRT N PFNVPM RGAEY LSSVRLCF VWLNGPGGLQMLPPVLSQPIY RAPSTA LRICRV R S
10	Danio	/5.9%	45./%	EAVSCRL TQ N PFKIPDAKIW-EEEF L AVRLCF VSITLSSGDFPLEPVVSQPIY RAP TA LKICKV R S
12	Deipninapterus	97.58	85.48	AIS RI TINN PF VPV SK RG Y L AVRLCF VTVR PAGRPLRLSPALSHPIF KAP TA LKICKV R S
13	Drosophila	97.33	23 38	ALS AL TAMPE VELOCITATION OF TO AVALUE VIVE PORT-PLALSPVLSHELF ARE LA LALLAV & S Altradefidindewicesubforcest i. sudice venegations of the same -shivitorices
14	Enhydra	95 5%	86.1%	ATS RT T NO PF VDT DE R-G Y TAVRICF VTWR PAR-PIRLSPUTSHTF NAP TA LKICRV R S
1.5	Equus	97.5%	87.6%	AIS RI T THE VIE R-GY L AVRICE VIVE PAGE-PLELSPVLSHEIF RAP TA LKICRY R S
16	Felis	97.8%	89.1%	AIS RI TIN PF VPI DCRG Y L AVRLCF VTVR PAGRPLRLPPVLSHPIF RAP TA LKICRV R S
17	Galeopterus	98.2%	71.7%	AISORIOTNIN PFOVPISEORGDYDL:AVRLCFOVTVRDPSGRPLRLPPVLSHPIFDNRAPTALKICRVNRNS
18	Lonchura	78.0%	46.1%	AAVAERIRTNEXXXXVPABQRGGEYBLAAVRLCFOVWVRGPGGLQPLPPVLSQPIYDERAPSTABLRICRVERSS
19	Loxodonta	100.0%	84.9%	CAISORIOTNIN PFOVPISSORGOYOL AVRLCFOVTVROPSGRPLRLPPVLSHPIFON RAPNTACLKICRVNRNS
20	Macaca	99.5%	98.2%	CAITORIOTNNN PFOVPISSORGDYDL AVRLCFOVTVRDPSGRPLRLPPVLSHPIFDN RAPNTADLKICRVARNS
21	Manis	97.3%	85.6%	CAISORIOTNNN PFOVPIBBORGDYDL AVRLCFOVTVRDPAGRPLRLSPVLSHPIFDN RAPNTADLKICRVARN S
22	Microcebus	99.6%	92.2%	CAISORIOTANNA PFOVPINGORGOYOLAAVRLCFOVTVROSSGRPLRLPPVLSHPIFOXRAPATAALKICRVARAS
23	Odocoileus	98.5%	86.9%	CAISORI TANNA PFOVPISSORG'Y LANVRLCFOVTVR PAGRPLRLVPVLSHPIFON RAPATA LKICRV R'S
24	Oncorhynchus	88.7%	37.4%	EAVSCRL TO PFNIPEANMW-E-EF L AVRLCF ASITLPTGELCPLEPVVSQPIY RAP TA LKICRV R S
25	Ornithorhynchus	48.1%	78.4%	OAIT ORM TINN PERVPLER RG.Y. LAVRLCF VTVQ SAGRPLALPPVLSQPIY MAP TA LKICRV R S
26	Orycteropus	98.0%	90.1%	AIS RI T N PF VPI D RG Y L AVRLCF VTVR SSGRPLRLPPVLSHPIF RAP TA LKICRV R S
21	Otolemur	99.68	92.28	CAIS ORI TINN PF VPI SCRG Y LLAVRLCF VIVR PSGRPLRLPPVLSHPIF CAP TA LKICKV R S
20	Physeter	100.03 97 58	99.03 81 /l&	AIS XI INNEF VELSE K-G I L AVKLE VIVEDGK-FLKLEPVLSEIF KAF IA LKLKV K S
30	Piliocolobus	100 08	01.40	ATO ATO ATO AND FAR AND
31	Rattus	99 1%	88.8%	ATS RET THE PERFORMENCE OF A AVRICE VIVE PSGR -PIRLIPVISHPIF RAP TA LKICKY R S
32	Rhinopithecus	100 0%	98 4%	ATTORTOTION OF VPT ROR-GOVILAVELCE VTVR DSGR-PICLEPVISHDEDNRAD TA LETCRV BIS
33	Scleropages	94.9%	37.8%	EAIACRL TL PENVPEADIW-SEEY L TVRLCF ASILLOSGERYSLEPVVSOPIY RAP TA LKICRV R S
34	Sus	97.5%	87.1%	AIN RI T PF VPI RG Y L AVRLCF VTVR PAGRPLRLPPVLSHPIF RAP TA LKICRV R S
35	Xenopus	91.8%	49.0%	DAIAHRIRT NNN PFNVPPSISLKSSVILN TVCLCFSVFIPSRA-AGQVVPLPFVVSQPIYSKRAPSTASLKICRVSRSS
	consensus/100%			tAlttR.ph.shs.tp.hph LssVpLCF s.htLslSpPIa p+Au-LhICRlspsS
	consensus/90%			pAlspRlpTpWNPFpVP.pc.hu-YoLNuVRLCF@VhlptsuGth.LsPVlSpPIa0%RAP%TAELKICRV/R%S
	consensus/80%			pAISORIOTNEN PFpVPLEDp+GOYOLNAVELCFOVOVCOPUGCshtLSPVLSpPIaDNEAPNTADLKICEVNENS
	consensus/70%			CAIOORIOTNNN PFOVPLEEORGOYOLNAVRLCFOVTVROPUGRPLRLSPVLSHPIFONRAPNTABLKICRVARNS
-				
		COV	pid 401	
NI	imeracion de proi	Linas (p	bb numana)	231 255,6 260 265 275
1	llomo	100 0%	100 0%	COLOCIE TELLO MUNICIPALITA INVERION COLOCIE A DOCESSIA MUNICIPALITATION A DEDICI
1	Homo	100.0%	100.0%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3	Homo Alligator	100.0% 95.8%	100.0% 49.2% 96.3%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VRFFRDTW A-RGSFS A VHR VAIVFKTPPYA QALREPVTVHM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VVFTGPCW A-RGSFS A VHR VAIVFTDPYA DSL ADVDVFM LRPS
1 2 3 4	Homo Alligator Aotus Camelus	100.0% 95.8% 92.9% 97.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3%	GSCLGGD: IFLLC KV K = I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K = I VFFFRDTW A-RGSFS A VHR VAIVFKTPPYA QALREPVTVHM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K = I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFFTPPYA PSL APVRVM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K = I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFFTPPYA PSL APVRVM LRRPS
1 2 3 4 5	Homo Alligator Aotus Camelus Canis	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2%	GSCLGGD: IFLLC: KV K & D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE: IFLLC: KV K D I VFFTGPTW A-RGSFS A VHR VAIVFKTPPYA QALREPVTVHM LRRPS GSCLGGD: IFLLC: KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC: KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLLC: KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6	Homo Alligator Actus Camelus Canis Castor	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1%	GSCLGGD: IFLLC KV K & I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFKTPPYA QALREPVTVHM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2%	GSCLGGD: IFLLC KV K & I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFKTPPYA QALREPVTVHM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 98.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1%	GSCLGGD: IFLLC KV K & I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA QALREPVTVHM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 98.5% 59.2%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8%	GSCLGGD: IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE: IFLC KV K B I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD: IFLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio	$\begin{array}{c} 100.0\$\\ 95.8\$\\ 92.9\$\\ 97.5\$\\ 96.6\$\\ 97.6\$\\ 99.8\$\\ 98.5\$\\ 59.2\$\\ 75.9\$ \end{array}$	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7%	GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCCGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCCGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCCGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCCGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCCGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCCGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	Homo Alligator Aotus Camelus Canelus Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus	$\begin{array}{c} 100.0\$\\ 95.8\$\\ 92.9\$\\ 97.5\$\\ 96.6\$\\ 97.6\$\\ 99.8\$\\ 98.5\$\\ 59.2\$\\ 75.9\$\\ 97.5\$\end{array}$	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4%	GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFA A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	Homo Alligator Aotus Camelus Canelus Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 98.8% 98.5% 59.2% 75.9% 97.5% 97.3%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7%	GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K D I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K D I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 98.5% 59.2% 97.5% 97.3% 92.2%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 85.4%	GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA SSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA SSL APVRVSM LRRPS ATVFGNTQIILLCEKVAK I ISVRFFEEKNGQSVW A-FGDFQHT VHK TAITFKTPRYHTLDITEPAKVFI LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 98.5% 59.2% 97.5% 97.5% 97.3% 92.2% 95.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1%	GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K B I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGD IFLLC KV K B I VYFTGP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus	$\begin{array}{c} 100.0\$\\ 95.8\$\\ 92.9\$\\ 97.5\$\\ 96.6\$\\ 97.6\$\\ 99.8\$\\ 98.5\$\\ 59.2\$\\ 75.9\$\\ 97.5\$\\ 97.5\$\\ 97.5\$\\ 97.5\$\\ 97.5\$\\ 92.2\$\\ 95.5\$\\ 97.58\\ 97.58\\ 9$	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6%	GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Calaestarwa	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 98.5% 59.2% 75.9% 97.5% 97.3% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7%	GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Loochura	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 98.5% 59.2% 75.9% 97.3% 97.3% 95.5% 97.5% 97.5% 97.8% 98.2% 97.8%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1%	GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 98.5% 97.6% 97.5% 97.3% 97.3% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.8% 98.2% 98.2%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9%	GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA SSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA SSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGGO IFLLC KV K I I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 10 11 12 13 14 15 16 17 18 9 20	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Dalphinapterus Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 98.5% 59.2% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.8% 97.8% 97.8% 97.5% 97.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2%	GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 2 13 14 15 16 17 18 19 20 21	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis	100.0% 95.8% 92.9% 97.6% 97.6% 98.8% 98.5% 59.2% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6%	GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 99.8% 95.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.8% 97.8% 97.8% 97.8% 97.3% 99.6%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2%	GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA P
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 9 20 21 22 23	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 59.2% 75.9% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.8% 98.2% 78.0% 100.0% 99.5% 99.5% 98.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.1% 86.1% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9%	GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL AP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 9 20 21 22 23 24	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 59.2% 75.9% 97.5% 97.3% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.8% 97.8% 97.3% 99.5% 98.2% 78.0%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4%	GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC K
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 2 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Oncorhynchus Ornihorhynchus	100.0 95.88 92.98 97.68 97.68 98.58 59.28 97.59 97.59 97.58 98.28 97.58 98.28 97.58 98.28 97.58 97.58 97.58 98.28 97.58	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4%	GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA SSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA SSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I I VYFTGP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 11 12 13 14 15 16 17 18 20 21 22 24 25 26	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornichorhynchus Orycteropus	100.0 95.88 92.98 97.68 97.68 98.58 59.28 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 98.28 78.08 100.08 99.58 99.68 88.78 99.68 98.58 88.78 98.58	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 90.1%	GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG: IFLLC KV K
$\begin{array}{c} 1 \\ 2 \\ 3 \\ 4 \\ 5 \\ 6 \\ 7 \\ 8 \\ 9 \\ 10 \\ 11 \\ 12 \\ 13 \\ 14 \\ 15 \\ 16 \\ 17 \\ 18 \\ 20 \\ 22 \\ 23 \\ 24 \\ 25 \\ 26 \\ 27 \\ 10 \\ 22 \\ 25 \\ 26 \\ 27 \\ 10 \\ 22 \\ 25 \\ 26 \\ 27 \\ 10 \\ 20 \\ 22 \\ 27 \\ 10 \\ 20 \\ 20 \\ 20 \\ 20 \\ 20 \\ 20 \\ 20$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus	100.0% 95.8% 92.9% 96.6% 97.6% 99.8% 97.6% 98.5% 59.2% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 99.6%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 90.1% 92.2%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VRFFRDGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA QALREPVTVHM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL AP
$\begin{array}{c}1\\2\\3\\4\\5\\6\\7\\8\\9\\10\\11\\12\\13\\14\\15\\16\\17\\18\\9\\20\\22\\23\\24\\25\\26\\27\\28\\27\\28\\26\\27\\28\\28\\26\\27\\28\\28\\26\\27\\28\\28\\28\\28\\28\\28\\28\\28\\28\\28\\28\\28\\28\\$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus	100.0% 95.8% 92.9% 96.6% 97.6% 99.8% 99.8% 95.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.6% 92.2% 95.5% 97.6% 97.5% 97.6% 97	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 90.1% 92.2% 90.8%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVS
$\begin{array}{c}1\\2\\3\\4\\5\\6\\7\\8\\9\\10\\11\\12\\13\\14\\15\\16\\17\\18\\9\\20\\21\\22\\3\\4\\25\\22\\7\\28\\22\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter	100.0% 95.8% 92.9% 96.6% 97.6% 99.8% 99.8% 95.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.8% 92.2% 97.5% 97.8% 92.2% 97.8% 92.8% 92.8% 97.5% 97.8% 98.2% 98.2% 98.2% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 97.3% 98.6% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 97.3% 98.5% 97.3% 98.5% 97.3% 97.3% 97.3% 97.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 99.8% 81.4% 92.2%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGP
$\begin{array}{c}1\\2\\3\\4\\5\\6\\7\\8\\9\\10\\11\\12\\3\\4\\15\\16\\17\\18\\9\\20\\22\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxdonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Otolemur Pan Physeter Filiocolobus	100.0% 95.8% 92.9% 97.5% 96.6% 97.6% 99.8% 59.2% 75.9% 97.5% 97.3% 97.5% 97.3% 97.5% 97.3% 97.8% 97.3% 97.3% 97.3% 99.6% 100.0% 99.6% 100.0% 97.5%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 90.1% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 92.2% 93.8% 81.4% 93.7%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRP
$\begin{array}{c}1\\2\\3\\4\\5\\6\\7\\8\\9\\1\\1\\1\\2\\1\\1\\1\\1\\1\\1\\1\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2\\2$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus	100.0 95.88 92.98 97.68 97.68 98.58 59.28 97.58 97.58 97.59 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 98.28 100.08 97.38 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 90.1% 92.2% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.4%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VRFTGPTW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA QALREPYTVHM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSF
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 2 13 4 15 6 7 1 8 9 20 2 2 2 3 2 4 2 5 6 2 8 9 3 3 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus	100.0% 95.8% 92.9% 96.6% 97.6% 99.8% 59.2% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 98.5% 88.7% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.5% 80.0% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 99.6% 90.0% 90.6% 90.6% 90.6% 90.6% 90.6% 90.6% 90.5% 90.6% 90.5% 90	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 90.1% 92.2% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.4% 98.7%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VRFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVFM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFTTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLC KV K I
$\begin{array}{c}1\\2&3&4\\5&6&7\\9&10&11&2\\1&3&1&4\\1&5&6&7\\1&1&2&2&2&2&2\\2&2&2&2&3&3&3\\3&3&3&4\\2&2&2&2&2&3&3&3\\3&3&4&2&2&2&3&3\\3&3&4&2&2&2&3&3\\3&3&4&2&2&2&3&3\\3&3&4&2&2&2&3&3\\3&3&4&2&2&2&2&3\\3&3&4&2&2&2&2&3\\3&3&4&2&2&2&2&3\\3&4&2&2&2&2&2&3\\3&4&2&2&2&2&2&3\\3&4&2&2&2&2&2&3\\3&4&2&2&2&2&2&3\\3&4&2&2&2&2&2&2&3\\3&4&2&2&2&2&2&2&3\\3&4&2&2&2&2&2&2&3\\3&4&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2\\3&4&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&2&$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages	100.0 95.88 92.98 97.68 97.68 97.68 99.88 59.28 97.59 97.58 97.59 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 98.58 98.58 98.58 98.58 98.58 98.58 98.58 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.78 99.68 88.75 99.58 88.78 99.68 88.78 99.68 88.75 99.58 99.58 99.68 99.68 99.68 99.68 99.58 99.58 99.68 99.58 99.58 99.58 99.58 99.58 99.58 99.68 99.58 99.58 99.58 99.58 98.58 99.58 99.58 99.58 99.58 99.58 99.58 99.58 99.558 99.58	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 98.2% 86.9% 37.4% 90.1% 92.2% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.4% 37.8% 87.1%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA QALREPVTVHM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG
$\begin{array}{c}1\\2&3&4\\5&6&7\\8&9&10\\1&1&2&3&4\\1&1&1&1&1&1\\1&1&1&1&1&1&1\\1&1&1&1&1&1$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Cholemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus	100.0% 95.8% 92.9% 96.6% 97.6% 99.8% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.5% 97.8% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 99.6% 88.7% 99.6% 99.75% 99.6% 90.6% 9	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 90.1% 92.2% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.4% 37.8% 87.1%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA QALREPVTYHM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A
$\begin{array}{c}1\\2&3&4\\5&6&7\\8&9&10\\1&1&2&1&3\\1&1&5&1&6\\1&1&1&2&2&2&2&2\\2&2&2&2&2&2&3\\3&3&3&3&3&3\\3&3&3&5\\\end{array}$	Homo Alligator Aotus Camelus Camelus Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Ornithorhynchus Cholemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus	100.0% 95.8% 92.9% 96.6% 97.6% 99.8% 97.5% 97.6% 97.5% 97.5% 97.5% 97.3% 97.5% 97.3% 97.5% 97.3% 97.5% 97.3% 97.3% 97.3% 97.3% 97.3% 97.3% 98.0% 99.5% 98.5% 98.5% 98.5% 98.5% 98.6% 100.0% 99.6% 100.0% 97.5% 99.1%	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 98.2% 86.9% 37.4% 78.4% 90.1% 92.2% 99.8% 81.4% 98.2% 85.6% 92.2% 99.8% 81.4% 98.2% 87.1% 88.8% 98.4% 37.8% 87.1% 49.0%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGGE IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGP
$\begin{array}{c}1\\2&3\\4&5\\6&7\\8&9\\10&112\\1&3&14\\1&5&6\\1&1&1&9\\2&2&2&2&2&2\\2&2&2&3&3&3\\3&3&3&3&3&3\\3&3&3&5\end{array}$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Oncorhynchus Oncorhynchus Oncorhynchus Oncorhynchus Oncorhynchus Oncorhynchus Oncorhynchus Oncorhynchus Conteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Ratus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/100%	100.0 95.88 92.98 97.68 97.68 98.58 97.59 97.59 97.59 97.59 97.59 97.58 97.59 97.58	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 78.4% 92.2% 98.8% 86.9% 37.4% 78.4% 92.2% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.4% 37.8% 87.1% 49.0%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCRGE IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA QALREPTVTMM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPYA PSL APVRVSM LRRPS
$\begin{array}{c}1\\2&3\\4\\5&6\\7&8\\9\\10\\11\\12&3\\14\\15\\16\\7&18\\20\\22&2\\4\\25\\22\\7&8\\33\\33\\3\\3\\3\\3\\3\\3\\5\end{array}$	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Castor Cercocebus Cervus Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Loxodonta Macaca Macaca Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Oracthorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/10% consensus/80%	100.0 95.88 92.98 97.68 97.68 97.68 98.58 59.28 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 97.80 97.38 98.58 88.78 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.58 88.718 98.05 8 8.05 8 8.05 8 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.58 91.05 8 91.88 94.98 91.88	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 85.6% 92.2% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.7% 88.8% 98.4% 37.8% 87.1% 49.0%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA OALREPTVHM LARPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 1 1 2 3 4 4 5 6 7 8 9 10 1 1 2 1 3 1 4 1 5 6 7 1 1 2 2 1 2 2 3 4 2 2 2 7 2 2 9 0 3 3 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	Homo Alligator Aotus Camelus Canis Carocebus Cervos Coturnix Danio Delphinapterus Desmodus Drosophila Enhydra Equus Felis Galeopterus Lonchura Lonchura Loxodonta Macaca Manis Microcebus Odocoileus Oncorhynchus Ornithorhynchus Orycteropus Otolemur Pan Physeter Piliocolobus Rattus Rhinopithecus Scleropages Sus Xenopus consensus/10% consensus/0%	100.0 95.88 92.98 97.68 97.68 97.68 97.58 97.59 97.59 97.59 97.59 97.59 97.59 97.59 97.58 97.58 97.58 97.58 97.58 98.58 98.58 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.58 99.68 99.58 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.58 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.88 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.68 99.888 99.888 99.888 99.888 99.888 99.888 99.888 99.888 99.8888 99.8888 99.8888 99.88888 99.88888 99.8888888 99.88888888	100.0% 49.2% 96.3% 87.3% 88.2% 84.1% 98.2% 87.1% 55.8% 45.7% 85.4% 86.7% 23.3% 86.1% 87.6% 89.1% 71.7% 46.1% 84.9% 98.2% 85.6% 92.2% 86.9% 37.4% 82.6% 99.8% 81.4% 99.8% 81.4% 98.7% 88.8% 98.4% 37.1% 49.0%	GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VYFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGPGW A-RGSFS A VHR VAIVFRTPPYA PSL APVRVSM LRRPS GSCLGG IFLLC KV K I VFTGP

		CC	v	pid	481						5				•			•			:		560
Nu	meración de	prolinas ((p65	human	a)		283		290	C					316	320,	2,4.	-6	334			342,4	
1	Homo	100.0)용 1	00.0%	F	LS	PM	E F o	YLP	DTDI	RHRI	KRKRTY	TF	KSIMKK	SPFS	GPT	PRP	-PPRR	IAVPSR	SS	3	ASVPKPA	
2	Alligator	95.8	38 .	49.2%	F	vs.	PM	FR	YLPI	EEG	FHCI	KRKRTR	DTF	KSFVQK	TPFA	AAVS	SQEPI	RHPRR	IAVPAR	P#		MGAPKPS	
3	Aotus	92.9	98	96.3%	F	LS	PM	E F Q	YLP	DTDI	RHRI	KRKRTY	TF	KSIMKK	SPFS	GPT	PRP	-PPRR	IAVPSR	s	3	ASIPKPA	
4	Camelus	97.5	58	87.3%	F	LS	PM	E F Q	YLP	TDI	RHRI	KRKRTY	TF	KSIMKK	SPFN	IGPT	PRP	-PTRR	IAVPSR	s	3	ASIPKPA	
5	Canis	96.6	58	88.2%	F	LS	PM	E F Q	YLP	TDI	RHRI	KRKRTY	TF	KSIMKK	SPFN	IGPT	PRP	-PPRR	IAVPSR	S1	[TSVPKPA	
6	Castor	97.6	58	84.1%	F	LS	PM	E F Q	YLP	DTDI	RHRI	KRKRTY	TF	KSIMKK	SPFN	IGPT	PRP	-PSRR	IAVPSR	s	3	ASIPKPA	
7	Cercocebus	99.8	38	98.2%	F	LS	PM	E F o	YLP	DTDI	RHRI	KRKRTY	TF	KSIMKK	SPFS	GPT	PRP	-PPRR	IAVPSR	LNS	3	AVPKPA	
8	Cervus	98.5	58	87.1%	F	LS	PM	e F o	YLP	D	RHRI	KRKRTY	TF	KSIMKK	SPFN	IGPT	PRP	-PTRR	IAVPNR	s	3	ASIPKPA	

9	Coturnix	59.2%	55.8%	RQRSPPLDFRYLPHQGKEKRGGHPYIAPLGSCWEHDVTMGSP	TQPWGP-
10	Danio	75.9%	45.7%	R VS PMDF YLPSDP EHRLM KRKRTEGMLHNLKLSSIITGSSMSAERRPFPTAKRTLPVSKQP	VAASAPA
11	Delphinapterus	97.5%	85.4%	R SLS PM SFOYLP TO RHRISS KRKRTY TFKSIMKKSPFNGPT HRP-PTRRIAVPSRSS	TSVPKPP
12	Desmodus	97.3%	86.7%	R SLS PM SFOYLP TO RHRISS KRKRTY TFKSIMKKSPFNGPT PRP-PPRRIAVPSRSS	TSIPKPA
13	Drosophila	92.2%	23.3%	GVTS ALPFEYVPMDS PAHLRRKRQKTGGDPMHLLLQQQQKQQLQNDHQDGRQTNMNCWNTQNIPPIKTEI	PRDTSPQPF
14	Enhydra	95.5%	86.1%	RSLSSPMSFOYLPSTOSRHRISSKRKRTYSTFKSIMKKSPFNGPTSPRP-PPRRIAVPSRST	TSVPKPA
15	Equus	97.5%	87.6%	RELS PMEFOYLPET DERRIESEKRKRTYETFKSIMKKSPFNGPTEPRPPPRRIAVPARSS	ASVPKPA
16	Felis	97.8%	89.1%	RELSEPMEF YLPETOERHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSPFNGPTERP-PPRRIAVPSRSS	AAVPKPA
17	Galeopterus	98.2%	71.7%	RELS PMEFOYLPETERRIESEKRKRTYETFKSIMKKSPFNGPTEPRP-PSRRIAVPSRSS	TSVPKPA
18	Lonchura	78.0%	46.1%	RQRSAPLDFRYLPHQG LQCI == KRKRTR TFRSFIQRSPLPAPASGESRPPRRLAVPSRPP	PAPQNPP
19	Loxodonta	100.0%	84.9%	RELS PMEFOYLPET DERRISE KRKRTY TFRSIMKKSPFNGPT PRP-PARRIAVPSRSS	ASIPKPA
20	Macaca	99.5%	98.2%	RELS PMEFOYLPETERRIESEKRKRTYETFKSIMKKSPFSGPTEPRPPPRRIAVPSRSS	VVPKPA
21	Manis	97.3%	85.6%	RELS PMEFOYLPET DERRISE KRKRTY TFKSIMKKSPFNGPT PRP-PPRRIAVPSRSS	TSVPKPA
22	Microcebus	99.6%	92.2%	R:LS:PM:F;YLP:T:RHRI::KRKRTY:TFKSIMKKSPFSGPT:PRP-PPRRIAVPSRST	TSIPKPA
23	Odocoileus	98.5%	86.9%	R:LS:PM:F;YLP:T:RHRI::KRKRTY:TFKSIMKKSPFNGPT:PRP-PTRRIAVPNRGS	ASIPKPA
24	Oncorhynchus	88.7%	37.4%	R VS PMDF FLPSDP EYRLM KRKRTEGMLQNLKLGSLMSG-TMPAETRPFNIARRTVTAKPA	ASQPV
25	Ornithorhynchus	48.1%	78.4%	R:LS:PM:F;YLP:P:RHRI::KRKRTYDAFKSIVKKSPFSAGTADSR-S	
26	Orycteropus	98.0%	90.1%	R:LS:PM:F;YLP:T:RHRI::KKKRTY:TFKSIMKKSPFNGPT:PRP-PPRRIAVPSRSA	ASVPKPA
27	Otolemur	99.6%	92.2%	R LS PM F YLP T O RHRI S KRKRTY TFKSIMKKSPFSGPT PRP-PPRRIAVPSRST	TSVPKPA
28	Pan	100.0%	99.8%	R:LS:PM:F;YLP:T:RHRI::KRKRTY:TFKSIMKKSPFSGPT:PRP-PPRRIAVPSRSS	ASVPKPA
29	Physeter	97.5%	81.4%	R:LS:PM:F;YLP:T:RHRI::KRKRTY:TFKSIMKKSPFNGPT:HRP-PTRRIAVPSRSS	ASVPKPA
30	Piliocolobus	100.0%	98.7%	R:LS:PM:F;YLP:T:RHRI::KRKRTY:TFKSIMKKSPFSGPT:PRP-PPRRIAVPSRSS	ASVPKPA
31	Rattus	99.1%	88.8%	R:LS:PM:F;YLP:T:RHRI::KRKRTY:TFKSIMKKSPFNGPTEPRP-PPRRIAVPSRGP	TSVPKPA
32	Rhinopithecus	100.0%	98.4%	R:LS:PM:F_YLP:T):RHRIE:KRKRTY:TFKSIMKKSPFSGPT:PRP-PPRRIAVPSRSS	ASVPKPA
33	Scleropages	94.9%	37.8%	G VS PMDFHYLPAEP EYRLM KRKRTEGMFQNLKLGPIMSTGSTTGERRPFTTAKRTVTVSKPS	TVMVPPV
34	Sus	97.5%	87.1%	RELS PMEFOYLPETERRIESEKRKRTYETFKSIMKKSPFNGPTEPRP-ATRRIAVPSRSS	ASVPKPA
35	Xenopus	91.8%	49.0%	K VS PM F YLP EV PHHID KRKRTLDSFKHYVKN-PFAGGETRTPRRIAVPNRIV	PTKSEPI
	consensus/100%			t.hS.sh.FpalPscph.ctt.	
	consensus/90%			R ls PM-FpYLPpps .a+lt KRKRT.thapshhhps.hsusst.tshphAh.shs.	s.stP.
	consensus/80%			R 1S PM F YLP ss CHRI KRKRTh-TFKS1hKKSPFsGPTsscs.ssRIAVPsRss	.suhPcPs
	consensus/70%			R LS PM F YLP T O RHRI SKRKRTY TFKSIMKKSPFsGPT PRP.PsRRIAVPoRuo	.solPKPA

		cov	pid 561			6	•	•		. 640
Nur	meración de pro	olinas	(p65 humana) 346,8,350	364 369	381,3,4				
1	Homo	100.	.0% 100.0%	PPYPFTSSLSTI	NYDEFPTMVFPSG	IS A-SA-LAPAPP				v
2	Alligator	95.	.8% 49.2%	SAQPGPS	,	VLPGM-GGAPAPLPQPQ	LKP		-PSAFP	FA
3	Aotus	92.	.9% 96.3%	PPYPFTSSLSTI	NYDEFPTMVFPSE	IS A-SA-LAPAPP				ऽv
4	Camelus	97.	.5% 87.3%	PPYPFTPSLSTI	NFEEFSPMVFPSG	IPSQ-TSALAPAPAP-	VL		-AQTSAPAP	APAMA
5	Canis	96.	.6% 88.2%	PSYPFTPSLSTI	FE FSPMVFSSG	ISSQ-TSALASAPAPA	PIL		-APA	
6	Castor	97.	.6% 84.1%	PPYAFTPSLSTI	NFDEFTPMVLPAG	IPSQ-ASALAPAPAPV	LA			
7	Cercocebus	99.	.8% 98.2%	PPYPFTSSLSTI	NYDEFPTMVFPSG	IS A-SA-LASAPP				ऽv
8	Cervus	98.	.5% 87.1%	PPYSFTPSLSTI	NFE FSPMVFPSG	IPSQ-TSALAPAPNP-	VL		-TQTPVLAP	APGMA
9	Coturnix	59.	.2% 55.8%		KSNYGV	LNPTM-GS				
10	Danio	75.	.9% 45.7%	SVPAVSAA	PPLKPPPTSF-FS	PPPGQLFTQQKMEPSPL	PAS		-SSDIWK	YLQAMSV
11	Delphinapterus	s 97.	.5% 85.4%	PPYPFTPSLSTI	NFEEFSPMVFPSG	IPSQ-TSALAPAPAL-	VL		-AQAPAP	APAMA
12	Desmodus	97.	.3% 86.7%	PPYPFTPSLSTI	NFE FSPMVF-SG	IPSQ-TSALAPAPAP-	IL		AQAPAP	APSMA
13	Drosophila	92.	.2% 23.3%	GLSYRAPPELTPS	POPLSPSSNYNHNST	PSPYNMASAVTPTNGQQ	QLMSPNHP	QQQQQQQQY	ATDLGSNYNP	PFAQQVLA
14	Enhydra	95.	.5% 86.1%	PPYPFTPSLSTI	NFEDFSPMVFPSG	IPNQ-TPALAPAPAP-	IL		-APVPAPAP	APAPI
15	Equus	97.	.5% 87.6%	PPYPFTPSLSTI	NFEDFSPMVFPSG	TIPSQ-TSALAPAPAP-	VL		-AQAPAP	APAMA
16	Felis	97.	.8% 89.1%	P PYPFTPSLSTI	NFE FSPMVFPSG	IPSQ-TPALAPAPAP-	IL		APAPASVP	APAPV
17	Galeopterus	98.	.2% 71.7%	P PYPFTPSLSTI	NFDEYSPMVYSSG	HIPSQ-ASGLAPAPVLA				
18	Lonchura	78.	.0% 46.1%	SAVPSPPAP	SFSFGG	PGGLL-GGPAPPEPE				
19	Loxodonta	100.	.0% 84.9%	P PYPFTPSLSTI	NFE FPPMIFSSG	IPSQ-APAPVLAPAPA	PAP		AMASTLAPVP	PASTPAMA
20	Macaca	99.	.5% 98.2%	P PYPFTSSLSTI	NYDEFPTMVFPSG	ITA-SA-LAPP				ऽ v
21	Manis	97.	.3% 85.6%	T PYPFTPSLSTI	NFE FSPMVFPSG	IPSQ-TSALAPAPAP-	VL		AQAPAP	APAMV
22	Microcebus	99.	.6% 92.2%	P PYPFTSSLSTI	NFDEFSPMVFPSG	IPSQ-ASALAPA				PT
23	Odocoileus	98.	.5% 86.9%	PPYSFTPSLSTI	NFEDFSPMVFPSG	IPSQ-TSALAPAPNP-	VL		-TQTPVLAP	TPGMA
24	Oncorhynchus	88.	.7% 37.4%	MNPVVPPS	AFSVKPQPYY-NG	PQPGKLFQTQPKAEA	SST		-AAETWK	FLNSLTL
25	Ornithorhynch	us 48.	.1% 78.4%							
26	Orycteropus	98.	.0% 90.1%	P PYPFTPSLSTI	NFEDFSPMMFSSG	MPSQ-APAPVLAQAP-				
27	Otolemur	99.	.6% 92.2%	S PYPFTPSLSTI	NFDEFPPMVFPSG	IASQ-ASALAPA				PT
28	Pan	100.	.0% 99.8%	P PYPFTSSLSTI	NYDEFPTMVFPSG	IS A-SA-LAPAPP				ऽ v
29	Physeter	97.	.5% 81.4%	PPYPFTPSLSTI	FE FSPMVFPSG	IPSQ-TSALAPAPAL-	VL		AQAPAP	APAMA
30	Piliocolobus	100.	.0% 98.7%	P PYPFTSSLSTI	NYDEFPTMVFPSG	IS A-SA-LASAPP				೧v
31	Rattus	99.	.1% 88.8%	P PYAFSTSLSTI	NFDEFSPMVLPPG	ISNQ-ALALAPSSAPV				
32	Rhinopithecus	100.	.0% 98.4%	PPYPFTSPLSTI	NYDEFPTMVFPSG	IR A-SA-LASAPP				ऽv
33	Scleropages	94.	.9% 37.8%	N-AVVPMV	SNSQIKPEQI-FG	PQPGQLFSQPKPVA	T		TSNTWF	FQPQ
34	Sus	97.	.5% 87.1%	P PYPFTPSLSTI	NFDEFTPMAFASG	IPGQ-TSALAPAPAP-	VL		-VQAPAPAP	APAMA
35	Xenopus	91.	.8% 49.0%	TASIRPSPSVE	PNP]	MVPSL-S			F	
	consensus/100	8								
	consensus/90%			s.ss.s.	s	st				
	consensus/80%			stshsulSsh	sapphsshG	.hstt.sss.ss				
	consensus/70%			s PYsFTsSLSTI	Na-BFssMsasuG;	pIsst.su.lssAPs				h

			cov	pid 64	1	:	•						7		. 720
Nu	meración de	prolinas	(p65	5 humana)	388 393	1,3,5,7	4	07,9,11,	15,7,8	423,4,6,8					
1	Homo	100	.0% 1	L00.0%	LPOAP	APAPAPAMV	SALAA	PAPVPVLA	PGPP	AVAPPAPKPT	AG	TLS	A	 	-
2	Alligator	95	.8%	49.2%	AAVPRO	GPPPLQALE	PASMAAMO	PPPVNTFS	TVNLEE	FSSLGLSPRPP	GEA	HLAD	A	 	-
3	Aotus	92	.98	96.3%	LPOAP	APAPAPPMV	SALAA	PA	PP01	MAPPAPKPT	AG	TLS	A	 	-
4	Camelus	97	.5%	87.3%	SALAQ	APAPV		PVLA	PGLA	AVAPPAPKTN	AG	TLT	A	 	-
5	Canis	96	.6%	88.2%		P	PA	PAPAPILA	PGLA	AMAPPAPKTT	AGE	TLT	A	 	-
6	Castor	97	.6%	84.1%	Q!	rli	PAQAMA	PAPVPVLA	PGPS	AVAPPAPKTT	PG ≊0	TLS	A	 	-
7	Cercocebus	99	.8%	98.2%	LPOAP	APAPASAMV	STLAA	PVPVPVLA	PGPP	AVAPPAPKPT	AG	TLS	A	 	-
8	Cervus	98	.5%	87.1%	STPAP	APAPG	MA	STLAQALA	PGLA	AVTPPAPKTN	TGE	TLT	A	 	-
9	Coturnix	59	.2%	55.8%										 	-
10	Danio	75	.98	45.7%	DSOPK	AVPVL				PFPS	GTVST	GRD-	ARL	 	-
11	Delphinapte	rus 97	.5%	85.4%	SALAQ	APAPG		PVLA	PGLA	AVTPPAPKTN	PAG	TLT	A	 	-

12	Desmodus	97.3%	86.7%	STLVQASAPVPVLASGLA AMAPPVPKPT AG GTLT A
13	Drosophila	92.2%	23.3%	00 0H000000H0H0H000H000000000 000SLOFHANPFGNPGGNSW SKFSAAAVAAAAATATGAAPANGN
14	Enhydra	95.5%	86.1%	
15	Equus	97.5%	87.6%	SALAQAPAPVPVLAAGLA AVAPPAPRTT AG GTLT A
16	Felis	97.8%	89.1%	PAPAPAPAPAPAPILAPGLA AVVPPAPKTT AG GTLT APAPAPAPILAPGLA AVVPPAPKTT AG GTLT A
17	Galeopterus	98.2%	71.7%	OTPAPGPVLA_VPTPAPVLASGPP_AVAPPATKNP_AG_GTLS_A
18	Lonchura	78.0%	46.1%	PLA -A
19	Loxodonta	100.0%	84.9%	SALAPAPAPAPAMASALA APTPGPVLAPSPA AVGPPAPKTA AG GTLT A
20	Macaca	99.5%	98.2%	LP APAPAPAPAMVSPLA APVPVPVLAPGPP AVAPPAPKPT AG GTLS A
21	Manis	97.3%	85.6%	SALAQAPAPGPVLAPGLT AVAPPAPKTT AG GTLT A
22	Microcebus	99.6%	92.2%	QVLSHTPAPTSAMASALA APAPVQVLAPGPL AVAPPAPKPT AG GTLT A
23	Odocoileus	98.5%	86.9%	STPAPAPAPGMASTLAQALAPGLA AVTPPAPKTN TG GTLT AMASTLAQALAPGLA MA
24	Oncorhynchus	88.7%	37.4%	DS PKATPVASFTTNPQASAATAASSQAFSTVNLLDFNGFAFHNFACPQEPVSAAPTPEP
25	Ornithorhynchus	48.1%	78.4%	
26	Orycteropus	98.0%	90.1%	APAMASALA_APAPVPVLAPGPA_AVAPPAPKAT_AG_GTLT_A
27	Otolemur	99.6%	92.2%	PVLAQVPAPAPAMVSALA APTPVPVLAPGPP_AIAPPAPKPT_AGDGTLT_A
28	Pan	100.0%	99.8%	LP APAPAPAPAMVSAL - A APAPVPVLAPGPP A - VAPPAPKPT AG GTLS A
29	Physeter	97.5%	81.4%	SALAQAPAPGPVLAPGLA_A-VTPPAPKTNPAG_GTLT_A
30	Piliocolobus	100.0%	98.7%	LP APAPAPAPAMVSALA APAPVPVLAPGPP AMVPPAPKPT AG GTLS A
31	Rattus	99.1%	88.8%	LAQTMVPSSAMVPSLA_PPAPVPVLAPGPP_SLSAPVPKST_AG_GTLS_A
32	Rhinopithecus	100.0%	98.4%	LP APAPAPAPAMVSALA APAPVPVLAPGPP AMVPPAPKPT AG GTLS A
33	Scleropages	94.9%	37.8%	PKATAATNFPPTVSAPSQSQDYSTVNLSDLYGYNFSPFPAAKEQGAKADNRFGSSTASVVPTEAPPAAES
34	Sus	97.5%	87.1%	SALAQAPAPVPVLAPGLA AVAPPAPKTN AG GTLT A
35	Xenopus	91.8%	49.0%	SMPVLKVDSVTSASTRLSTVNISDFSNLGFSSQPPPQSDPDRISFSMPVLKVDSVTSASTRLSTVNISDFSNLGFSSQPPPQSDPDRISFSMPVLKVDSVTSASTRLSTVNISDFSNLGFSSQPPPQSDPDRISFSMPVLKVDSVTSASTRLSTVNISDFSNLGFSSQPPPQSDPDRISFSMPVLKVDSVTSASTRLSTVNISDFSNLGFSSQPPPQSDPDRISF
	consensus/100%			
	consensus/90%			s.s.h.s.
	consensus/80%			hhusspshhs.sPpsstsu-GsLsEA
	consensus/70%			ssss

		COV	pid 721			:				•		•	8	800
Nur	meración de prol:	inas (p	65 humana)				460				483			
1	Homo	100.0%	100.0%	LLOLOFD-DE	D	LGALLG S	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	Q LL NÇ	GIP		VA	
2	Alligator	95.8%	49.2%	LLOLOFEGNA	D	GPGGLDLDAL	VDDVTYT	SLEAINT	A FR	LLQ	GQPG		-GGT	
3	Aotus	92.9%	96.3%	LLOLOFD-DE	D	LGALLG S	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	LM NC	SLP		VA	
4	Camelus	97.5%	87.3%	LLOLOFDADE	D	LGALLG N	NDTAVFT	DLASVDN	SEFO	LLT	GVP		IA	
5	Canis	96.6%	88.2%	LLOLOFDADE	D	LGALLG S	ADPAVET	DLASVDN	SEFO	LL NC	GVS		VA	
6	Castor	97.6%	84.1%	LLHLOFDADE	D	LGALLG S	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	LL NC	GVS		MP	
7	Cercocebus	99.8%	98.2%	LLQLQFD-DE	D	LGALLG S	TDPTVFT	DLASVDN	SEFO	2 LL NÇ	GVP		VA	
8	Cervus	98.5%	87.1%	LLOLOFDTDE	D	LGALLG N	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	LL NC	GVP		MG	
9	Coturnix	59.2%	55.8%											
10	Danio	75.9%	45.7%	ITA-ARGEN	TVLHP	YTLH-YTH-L	THV	-LLLV						
11	Delphinapterus	97.5%	85.4%	LLOLOFDADE	D	LGALLGSS	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GVP		-LA	
12	Desmodus	97.3%	86.7%	LLOLOFDADE	D	LGSLLG S	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GVP		MA	
13	Drosophila	92.2%	23.3%	SNNLSNLNNPFTMHN	LLTSGGGPGNANN	ILQWNL	TTN	HLHNQHT	LHQ	QLQ	QQQQ	QY	DNT	
14	Enhydra	95.5%	86.1%	LLOLOFDADE	D	LGALLGSS	ADPAVET	DLACVDN	SEFO	2 LL NÇ	GVS		AA	
15	Equus	97.5%	87.6%	LLOLOFDADE	D	LGALLGNN	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GVS		MA	
16	Felis	97.8%	89.1%	LLHLOFDADE	D	LGALLG S	ADPAVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GVS		VA	
17	Galeopterus	98.2%	71.7%	LLOLOFDADE	D	LGALLG S	TDPTVFT	DLASVDN	SEFO	ρ LL Nζ	GVS		MA	
18	Lonchura	78.0%	46.1%	LLOLOFEEGS	PQLGGSGTAPP	LDLGALLGGG	DSPFP	ALDPLNA	CEVO	RLLGI	PEPPP	SFGDE	SPDFG	
19	Loxodonta	100.0%	84.9%	LLOLOFDADE	D	LGALLGHS	TOPAVET	DLASVDN	SEFO	Ο ΓΓ Νζ	GVS		MA	
20	Macaca	99.5%	98.2%	LLOLOFD-DE	D	LGALLG S	TOPTVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GVP		VA	
21	Manis	97.3%	85.6%	LLOLOFD-DE	D	LGALLG S	TOPTVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	S-S		VA	
22	Microcebus	99.6%	92.2%	LLOLOFDADE	D	LGALLG S	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GVS		MA	
23	Odocoileus	98.5%	86.9%	$LL \bigcirc L \bigcirc F \boxdot T \boxdot E$	D	LGALLG N	TOPAVET	DLASVDN	SEFO	Ο ΓΓ Νζ	GVP		MG	
24	Oncorhynchus	88.7%	37.4%	TSTFGV-QGS	QFKV	EELP-EFPSF	SEAQAPG	TLDSINI	EEFO	AMLG	SCLA-	GEGPF	SSEAS	
25	Ornithorhynchus	48.1%	78.4%											
26	Orycteropus	98.0%	90.1%	LLOLOFDADE	D	LGALLGSS	TDPAVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GVS		MA	
27	Otolemur	99.6%	92.2%	LLOLOFDADE	D	LGALLGSN	TOPTVFT	DLASVDN	SEFO	Ο ΓΓ Νζ	GVS		MA	
28	Pan	100.0%	99.8%	LLQLQFD-DE	D	LGALLG S	T PAVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GIP		VA	
29	Physeter	97.5%	81.4%	LLOLOFDADE	D	LGALLG S	T PAVFT	DLASVDN	SEFO	QLLNC	GVT		MA	
30	Piliocolobus	100.0%	98.7%	LLOLOFD-DE	D	LGALLG S	TOPTVFT	DLASVDN	SEFO	Q LL Νζ	GVP		VA	
31	Rattus	99.1%	88.8%	LLHLOFDADE	D	LGALLG N	TDPGVFT	DLASVDN	SEFO	Q LL Νς	GVA		MS	
32	Rhinopithecus	100.0%	98.4%	LLOLOFD-DE	D	LGALLG S	TOPTVFT	DLASVDN	SEFO	Q LL Νς	GIP		VA	
33	Scleropages	94.9%	37.8%	SNTSTLLEA LRAEP	T-LC	VELH-DFHSF	SEVHTSG	TLDSINT	EDF	ALLG	TGDSA	STVPGLGPS	STSTHN	
34	Sus	97.5%	87.1%	LLOLOFDTDE	D	LGALLG N	TOPTVFT	DLASVDN	SEFO	Q LL NÇ	GVS		MP	
35	Xenopus	91.8%	49.0%	LNYPSFSG A	N	LDLVEMLPN-	DTESRCT	SLSSIDN	SDFS	LLSE	ESQT		SGTLS	
	consensus/100%												• • • • •	
	consensus/90%			hp.tt	s	hh	ss	tLtslp.	.c.p	t.ht.				
	consensus/80%			LLpL_Fp	D	LGthLss.	s-sssaT	sLsSlcs	uEFO	LLS	u.s		.hs	
	consensus/70%			LLQLQFD.DE	D	LGALLGss	O PSVFT	DLASVDN	SEFQ	Q LL NÇ	uls		.hs	

		COV	pid 80	ι.	•			:		•	•	. 88
Nur	meración de prol	inas (p6	5 humana)		486	491	49	7	510,	1,3,5,7 521,4		
1	Homo	100.0%	100.0%		P	HTT PMI	MYP	AITRLVTGA	RPP	PAPAPLGAPGLP	NGLLSC	3
2	Alligator	95.8%	49.2%		T	EPGPPMI	LSYP	SITRLVNSC	RGAP	GEDPSTSSFV	NGALO	G
3	Aotus	92.9%	96.3%		T	HTT PMI	м үр	AITRLVTGA	RPP	PAPAPLGAPGLP	GLLSC	G
4	Camelus	97.5%	87.3%		P	HAA PMI	мчр	AITRLVTGS	RPP	PAPTPLGASGLT	NGLLSC	G
5	Canis	96.6%	88.2%		P	HTA PMI	мчр	AITRLVTGS	RPP	PVPAPVGASGLP	NGLLSC	G
6	Castor	97.6%	84.1%		н	PTA PMI	мчр	AITRLVTGS	RPP	PAPTPLGVPGLP	NGLSC	G
7	Cercocebus	99.8%	98.2%		P	HTT PMI	м үр	AITRLVTGA	RPP	PAPAPLGAPGLP	GLLSC	G
8	Cervus	98.5%	87.1%		P	HTA PMI	м үр	AITRLVTGS	RPP	PAPTPLGPPGLT	NGLLSC	G
9	Coturnix	59.2%	55.8%									-
10	Danio	75.9%	45.7%									÷
11	Delphinapterus	97.5%	85.4%		P	HTA PMI	мчр	AITRLVTGS	RPP	PAPTPLGASGLT	NGLLSC	G
12	Desmodus	97.3%	86.7%		P	HTA PMI	мчр	AITRLVTGS	RPP	PAPIPLGASGLP	NGLLSC	G
13	Drosophila	92.2%	23.3%	APTNNNANLNNNNNNN	ragnqadnN	IGPTLSNI	LSFD	SGQLVHI			NSE	E
14	Enhydra	95.5%	86.1%		P	HIA PMI	мур	AITRLVTGS	RPP	PAPAPLGASGLP	GLLSC	G

15	Equus	97.5%	87.6%	PPHTA PMLM YP AITRLMSGS RPP PAPAPLGASGLP G	LLSG
16	Felis	97.8%	89.1%	PPPPPPPPIDA PMLM YP AITRLVTGS RPP PAPAPLGASGLP G	LLSG
17	Galeopterus	98.2%	71.7%	PPPHTA PMLM YP AITRLVTGS RPP PAPAPLGASGLP G	·LLSG
18	Lonchura	78.0%	46.1%	AGVPEPPPPPPPDFGGPPMLMSYP_AIARLVQSQPPGAPPEMGLGAELAGGPE	LGGLGGP
19	Loxodonta	100.0%	84.9%	PPPAA DPMLM YP AITRLVTGS RAP DVPAPLGASGLA G	·LLSG
20	Macaca	99.5%	98.2%	PPPPTT PMLM YP AITRLVTGA RPP PAPAPLGAPGLP G	·LLSG
21	Manis	97.3%	85.6%	PPPHTA PMLM YP AITRLVTGS RPP PAPTPLGASGLT G	·LISG
22	Microcebus	99.6%	92.2%	PPPHTA PMLM YP SITRLVTGS RPP PAPNPLGASGIP G	·LLSG
23	Odocoileus	98.5%	86.9%	PPPHTA PMLM YP AITRLVTGS RPP PAPTPLGPPGLT G	·LLSG
24	Oncorhynchus	88.7%	37.4%	APQAPCHLPSTNTVANNAAQNQADPANHHTGCGGSTWMNYPNSIVSLLQNEGMMDSSPG	NASQPAA
25	Ornithorhynchus	48.1%	78.4%		
26	Orycteropus	98.0%	90.1%	PPHAA PMLM YP AITRLVTGS RPP PAPTPLGASGLP G	·LLSG
27	Otolemur	99.6%	92.2%	PPHTA PMLM YP SITRLVTGS RAP PAPTPLGTSGLP G	LLSG
28	Pan	100.0%	99.8%	PPPTT PMLM YP AITRLVTGA RPP PAPAPLGAPGLP G	·LLSG
29	Physeter	97.5%	81.4%	PPPHTA PMLM YP AITRLVTGS RPP PAPTPLGASGLT G	·LLSG
30	Piliocolobus	100.0%	98.7%	PPPTT PMLM YP AITRLVTGA RPP PAPAPLGAPGLP G	·LLSG
31	Rattus	99.1%	88.8%	STAPPMLM YP AITRLVTGS RPP PAPATLGTSGLP G	LSG
32	Rhinopithecus	100.0%	98.4%	PPPTT PMLM YP AITRLVTGA RPP PAPAPLGAPGLP G	LLSG
33	Scleropages	94.9%	37.8%	PDLSADQTSSSTWMTYPNSIINLLQNEGIMDNVPA	PSFSA
34	Sus	97.5%	87.1%	PPPHTA PMLM YP AITRLVTGS RPP PAPTPLGASGLT G	·LLSG
35	Xenopus	91.8%	49.0%	AGLQEPGTSQGTLMSYPDSIARLMSNRPIED GEERIDSVLM G	VFDMQQG
	consensus/100%				
	consensus/90%			$\dots \dots $	
	consensus/80%			sspPMLMpYP_uIsRLlsutthss_sssussuh. G	1SG
	consensus/70%			Pass PMLMEYP AITRLVTGu @RsP PsPsPLGssGLs G	LhSG

		COV	pid 88	1.9.]9
Nu	meración de prol:	inas (pe	55 humana)	
1	Homo	100.0%	100.0%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
2	Alligator	95.8%	49.2%	DEMLPSMGELESALLSELGSS
3	Aotus	92.9%	96.3%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
4	Camelus	97.5%	87.3%	DEDFSSIADMDFSALLSOIGS
5	Canis	96.6%	88.2%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
6	Castor	97.6%	84.1%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
7	Cercocebus	99.8%	98.2%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
8	Cervus	98.5%	87.1%	DEDFSSIADVDFSALLS_ISS
9	Coturnix	59.2%	55.8%	
10	Danio	75.9%	45.7%	
11	Delphinapterus	97.5%	85.4%	DEDFSSIA MOFSALLS ISS
12	Desmodus	97.3%	86.7%	DEDFTSIA MOLSALLS ISS
13	Drosophila	92.2%	23.3%	DQQILRLNSEDLQISNLSIST
14	Enhydra	95.5%	86.1%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
15	Equus	97.5%	87.6%	DEDFSSISDMDFSALLSOISS
16	Felis	97.8%	89.1%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
17	Galeopterus	98.2%	71.7%	DEDFSSIA MOFSALLS ISS
18	Lonchura	78.0%	46.1%	E SLPSLGEL LSTFLS FPSS
19	Loxodonta	100.0%	84.9%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
20	Macaca	99.5%	98.2%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
21	Manis	97.3%	85.6%	DEDFSSIV MOFSALLN ISS
22	Microcebus	99.6%	92.2%	DEDFSSIV MOFSALLS ISS
23	Odocoileus	98.5%	86.9%	DEDFSSIADVDFSALLSOISS
24	Oncorhynchus	88.7%	37.4%	LD LDVLSSM EDRLMSILNSGNQYSFVPGHQT
25	Ornithorhynchus	48.1%	78.4%	
26	Orycteropus	98.0%	90.1%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
27	Otolemur	99.6%	92.2%	DEDFSSIA M FSALLS ISS
28	Pan	100.0%	99.8%	DEDFSSIA MOFSALLS ISS
29	Physeter	97.5%	81.4%	DEDFSSIADMDFSALLSOISS
30	Piliocolobus	100.0%	98.7%	D FSSIV M FSALLS ISS
31	Rattus	99.1%	88.8%	DEDFSSIA M FSALLS ISS
32	Rhinopithecus	100.0%	98.4%	DEDFSSIV M FSALLS ISS
33	Scleropages	94.9%	37.8%	L LDEFGSL EDRLMSIFNSTNQAGFMPGHPT
34	Sus	97.5%	87.1%	DEDFSSIA MDFSALLS ISS
35	Xenopus	91.8%	49.0%	VSITSLLLLSSFMNIK
	consensus/100%			
	consensus/90%			.p.hh.p.Dhs.h
	consensus/80%			DEDhsSls h hSuLLS luS
	consensus/70%			DEDFSSIuDMDFSALLSOISS

En la Tabla M.10 se muestran todos los residuos prolina de p65 humana según su posición y el grado de conservación observado a partir del alineamiento múltiple.

Posición del residuo prolina	Grado conservación (%)
1. 6	70

2. 10	70
3 13	70
0. 10	10
4. 19	80
5. 27	70
6. 47	90 (incl. secuencias parciales)
7 59	90(incl_secuencias narciales)
7. 55	
0. 09	90
9. 81	80
10. 82	100
11. 85	100
12 87	100
12.07	
13. 100	00
14. 140	90
15. 144	90
16, 168	80
17 172	70
10, 176	No concervedo
18. 176	No conservado
19. 177	90
20. 182	100
21, 189	90
22 231	70
22. 251	10
23. 255	100
24. 256	90
25. 260	70
26 265	90
27 275	100
21. 213	
28. 283	90
29. 290	100
30. 316	80
31, 320	80
32 322	70
32. 324	70
33. 324	70
34. 325	70
35. 326	No conservado
36. 334	80
37 342	80
38 344	90 (incl. socuencias parciales)
30. 344	So (incl. secuencias parciales)
39. 340	
40. 348	70
41. 350	No conservado
42. 364	No conservado
13 369	No conservado
44 201	No concervado
44. 301	No conservado
45. 383	No conservado
46. 384	70
47, 388	No conservado
48 391	No conservado
40, 202	No concervado
49. 393	No conservado
50. 395	No conservado
51. 397	No conservado
52. 407	No conservado
53 409	No conservado
54 111	No conservado
55. 415	NO CONSERVADO
56. 417	No conservado
57. 418	No conservado
58. 423	70
59 424	70
0U. 420	
61. 428	No conservado

62. 460	70
63. 483	No conservado
64. 486	70
65. 491	80
66. 497	80
67. 510	70
68. 512	70
69. 513	70
70. 515	70
71. 517	70
72. 521	No conservado
73. 524	No conservado

Tabla M.10: Enumeración de las prolinas presentes en p65 humana, según su posición en la secuencia aminoacídica y el grado de conservación obtenido del alineamiento multiple.

De las 73 prolinas presentes en p65 humana (NP_068810.3), solo 10 presentan un grado de conservación igual al 100%, o bien un grado equivalente descontando las secuencias aminoacídicas parciales utilizadas en el alineamiento. En la Tabla M.11 se presenta un resumen de las prolinas seleccionadas, su posición en la secuencia y los aminoácidos más próximos en la secuencia.

Posición prolina		Grado de conservación			Secuencia consenso	Aminoácido anterior	Aminoácido posterior
1.	47	90% parcia	incl Iles	sec.	RSAGSI <u>P</u> G +Ss	1	G
2.	59	90% parcia	incl Iles	sec.	Ss ssKTH <u>P</u> sI+	Н	ΤοΑ
3.	82	100%			VTKp. <u>Р</u> а+РНР	No conservado	НоҮ
4.	85	100%			p.Pa+PHPHpL	RoK	Н
5.	87	100%			a+PH <u>P</u> HpLVG+	Н	Н
6.	182	100%			.slSp <u>P</u> Ia p+	Η, Q ο Ε	Ι
7.	255	100%			AIsFpT <u>P</u> .a.p.	Т	Ρ, Α ο R
8.	275	100%			hpLpR <u>P</u> Sst.	R	S
9.	290	100%			.Fpal <u>P</u> sc	LoV	No conservado
10.	344	90% parcia	incl. Iles	sec.	s.stP	K, G o A	No conservado

Tabla M.11. Residuos prolina conservados de p65 humana.

Hipótesis y Objetivos

<u>Hipótesis</u>

En la sección Introducción se describió que en ensayos de gen reportero realizados en células Hek293T estimuladas con PMA, la sobreexpresión de FKBP52 potencia la actividad transcripcional de NF- κ B mientras que la sobreexpresión de FKBP51 tiene el efecto opuesto. Adicionalmente se evidenció la interacción directa entre estas IMMs y la subunidad p65 de NF- κ B. Otros antecedentes generados por diferentes grupos de investigación identifican a la proteína FKBP51 como parte del complejo de quinasas IKK, el cual está encargado de la fosforilación de la proteína inhibitoria de NF- κ B, I κ B (105-107).

Aun cuando nuestro laboratorio obtuvo recientemente evidencias sobre la participación de las FKBPs en la regulación de NF- κ B, existen pocas certezas sobre del mecanismo por el cual FKBP51 y FKBP52 parecen regular la actividad transcripcional de NF- κ B. Es sabido que NF- κ B regula diferentes procesos relevantes en la biología del cáncer, pero nada se conoce acerca de la importancia de su regulación por FKBPs en células tumorales.

La hipótesis principal de trabajo radica en que FKBP52 tiene un efecto estimulante sobre diferentes pasos dentro de la cascada de activación de NF- κ B y que además potencia los efectos biológicos del factor de transcripción. En virtud de estos supuestos, la actividad enzimática FKBP52 podría ser un potencial blanco farmacológico que regule la acción biológica de NF- κ B. Por ende, el uso de drogas que inhiban la actividad PPIasa de FKBP52 podría afectar entonces la actividad de NF- κ B y los diferentes procesos biológicos en los que este factor transcripcional participa. Si la activación de NF- κ B fuese análogo al modelo de activación de los RE por proteínas FKBPs, FKBP51 tendría un rol antagónico a FKBP52 en los distintos pasos de la activación de NF- κ B.

Objetivos generales

Con el fin de desentrañar el mecanismo por el cual las FKBPs modulan a NF- κ B, se estudiará la participación de FKBP51 y FKBP52 en la cascada de activación del factor de transcripción, así como también la contribución de los diferentes dominios de las FKBPs en estos procesos. En lo que respecta al uso de agentes estimulantes de la

actividad de NF-κB, en los estudios previos a este proyecto se ensayó como activador sólo al éster de forbol PMA. Es por ello, que en este trabajo se ensayarán variados agentes estimulantes a fin de determinar la especificidad de la respuesta antes observada. Como cierre del trabajo, se buscará estudiar los posibles efectos biológicos de FKBP51 y FKBP52 sobre la proliferación y muerte celular.

Para llevar a cabo los diferentes objetivos que involucran a FKBP51 y FKBP52, se hará uso de las estrategias de:

a. sobreexpresión de proteínas FKBP51 y FKBP52 *wild type* o mutantes con vectores de expresión eucariotas,

- a. sobreexpresión de dominios recombinantes de la estructura de las inmunofilinas.
- b. silenciamiento de FKBP51 con vectores shRNA específicos,
- c. o tratamiento con la droga FK506 como inhibidor de la actividad PPlasa.

Objetivos particulares

Los objetivos particulares que se desprenden de la hipótesis y los objetivos generales son:

 Evaluar el efecto modulador de FKBP51 y FKBP52 sobre la activación de NF-κB desencadenada por diferentes estímulos externos.

2- Estudiar la contribución de los diferentes dominios de FKBP51 y FKBP52
 en la regulación de la actividad transcripcional de NF-κB:

a. Efecto del dominio con actividad enzimática de PPlasa.

b. Efecto de los dominios TPR en su capacidad de regular la interacción de las FKBPs con Hsps.

3- Evaluar el efecto de estas FKBPs en distintos pasos de la señalización de NF-κB:

- a. Fosforilación de IkB,
- b. Degradación de IkB,
- c. Transporte retrógrado del factor de transcripción,
- d. Fosforilación de la subunidad p65
- e. Regulación de la proteína p65

4- Estudiar el efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre genes cuya expresión se encuentra regulada por NF-κB.

5- Estudiar la modulación de NF-κB mediada por FKBPs en una línea celular tumoral evaluando:

a. la interacción entre p65, FKBPs y Hsps

b. los efectos de la droga FK506 sobre procesos biológicos regulados por NF- κ B.

Estudiar los efectos de FKBP51 y FKBP52 sobre:

a. la muerte celular inducida por distintos agentes.

b. la proliferación celular.

Capítulo 1:

Modulación de NF-κB por *FK506-binding protein* 52-kDa.

Como se describió en la sección Introducción, las FKBPs de alto peso molecular, FKBP51 y FKBP52, son proteínas con actividad PPIasa. Estas FKBPs han sido caracterizadas tradicionalmente por ser co-chaperonas de proteínas de choque térmico (Hsps), en particular Hsp90, y ser parte importante dentro de la señalización de los receptores de hormonas esteroidales [(36, 38, 40, 57, 108), sección Introducción].

La familia de factores de transcripción NF- κ B, es capaz de regular la expresión de genes asociados a inflamación, proliferación, apoptosis, síntesis de citoquinas y metaloproteasas en respuesta a diferentes estímulos extracelulares [(109), sección Introducción]. NF- κ B puede ser activado por TNF- α , LPS, interleuquinas y por el éster de forbol PMA, entre otros agentes (83, 109). Los distintos miembros de la familia NF- κ B pueden formar dímeros o heterodímeros con diferente composición. Como ya se mencionó previamente [(78, 109), sección Introducción], el dímero más abundante está integrado por las subunidades p65 y p50

De forma inédita, los resultados previos demostraron que, además de su conocida función biológica sobre los receptores de esteroides, tanto FKBP51 como FKBP52 participan en la modulación transcripcional del factor NF-κB e interactúan con su subunidad p65. Los estudios comentados en la Introducción evidenciaron en la línea celular Hek293T que:

1- FKBP52 potencia la actividad transcripcional de NF-κB inducida por PMA,

2- FKBP52 interactúa preferencialmente con la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB en presencia de PMA,

3- y que FKBP52 favorece la retención nuclear de p65 luego del tratamiento con PMA.

En el presente capítulo se aborda el estudio de los Objetivos 1 a 5 (sección Objetivos) centrados en la inmunofilina FKBP52 y en su actividad PPIasa. En resumen, se evalúan los diferentes pasos dentro de la señalización de NF- κ B en células Hek293T: la actividad transcripcional de NF- κ B, la fosforilación de I κ B, la degradación de I κ B, la

fosforilación de la subunidad p65, el transporte retrógrado de p65 y la regulación de los niveles de proteína p65. Como resultado final del efecto de FKBP52, se analiza la contribución de esta FKBP en la expresión de genes regulados por el factor de transcripción NF- κ B. Finalmente, se analiza la regulación propuesta para FKBP52 y NF- κ B en una línea celular tumoral.

Evaluación de la actividad transcripcional de NF-κB inducida por TNF-α

Previamente, el grupo de trabajo reportó que la sobreexpresión de FKBP52 en células Hek293T potencia la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por PMA (ver Introducción). Con el objetivo de evaluar si esta regulación también ocurre frente a otros estímulos activadores de NF- κ B, se realizaron ensayos de gen reportero de la actividad transcripcional de NF- κ B en células Hek293T tratadas con TNF- α .

En la Figura 1.1 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de gen reportero realizados con células transfectadas con un plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52, 1µg) o con el vector vacío (vector, 1µg). Los resultados de actividad transcripcional fueron cuantificados según se detalla en la sección Materiales y Métodos, y expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Los valores de actividad transcripcional se relativizaron al grupo vector tratado con TNF- α (10 ng/ml), al cual se le asignó una actividad transcripcional de NF- κ B igual a 100 U.A. Al igual que en el caso de la estimulación con PMA, se observó un incremento significativo de la actividad transcripcional luego del tratamiento con TNF- α para células que sobreexpresan FKBP52 respecto al grupo transfectado con el vector vacío



Figura 1.1. Efecto de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B luego de la estimulación con TNF- α .

La actividad transcripcional de NF- κ B fue determinada por el ensayo de gen reportero para NF- κ B en células Hek293T a partir de la medición de la actividad enzimática codificada por el gen luciferasa normalizada con la actividad enzimática de β -galactosidasa (según sección Materiales y Métodos). Los resultados se expresan como el promedio de la actividad transcripcional de NF- κ B ± ES para los grupos transfectados con el plásmido codificante para FKBP52 (FKBP52, 1µg) o con el vector vacío (vector, 1µg) y tratados con TNF- α (10 ng/ml) durante 6 horas. Los valores obtenidos se presentan en unidades arbitrarias (U.A.), asignando 100 U.A. al grupo transfectado con el vector vacío e incubado con TNF- α . Referencias: Significativo respecto al grupo transfectado con vector vacío y tratado con TNF- α (**p<0,01).

Influencia de la actividad enzimática de PPIasa de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B.

Como ya se ha comentado (sección Introducción), la proteína FKBP52 pertenece a familia de las *FK506 binding proteins* de alto peso molecular y presenta 3 dominios funcionales: un dominio C- terminal TPR conteniendo al sitio de unión a Hsp90, un dominio N-terminal FK1 característico de la familia FKBP con actividad enzimática PPIasa, y un dominio intermedio FK2 que carece de actividad enzimática y une NTP. La actividad PPIasa de FKBP52 es inhibida con la droga inmunosupresora FK506 [(108), sección Introducción].

Con el fin de estudiar la contribución de la actividad enzimática de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF-κB, se realizaron ensayos de gen reportero en grupos de células transfectadas con 1 μg de plásmido que codifica para FKBP52 (FKBP52, 1μg) o vector vacío tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 horas y/o con una pre-incubación durante media hora con FK506 (1 μM). En la Figura 1.2 se muestran los resultados obtenidos. El tratamiento con FK506 evidencia una disminución significativa (p≤0,05) de la actividad transcripcional de NF-κB respecto del efecto estimulante de FKBP52 sobre de NF-κB. Esto sugiere que la actividad enzimática de PPIasa de FKBP52 es requerida para la estimulación de la actividad transcripcional de NF-κB.



Efecto de FK506 sobre la actividad transcripcional de NF-κB

Figura 1.2. Efecto de FK506 sobre el incremento en la actividad transcripcional de NF-κB inducido por la sobreexpresión de FKBP52.

La actividad transcripcional fue determinada mediante el ensayo de gen reportero para NF- κ B a partir de la medición de la actividad enzimática del gen luciferasa, normalizada con la actividad enzimática de β -galactosidasa (sección Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional de NF- κ B ± ES para los grupos tratados con PMA (100ng/ml), transfectados con plásmido FKBP52 (FKBP52, 1µg) o vector vacío (vector, 1µg) y/o incubados con FK506 (1µM). El tratamiento con FK506 se realizó mediante una pre-incubación de media hora antes del agregado de PMA por 6 horas. Los valores graficados fueron medidos en U.A, asignando 100 U.A. a las células transfectadas con el vector vacío y estimuladas con PMA. Referencias: Significativo respecto al grupo tratado con PMA (**p≤0,01).

Es sabido que el macrólido FK506 se une al dominio FK1 de la IMM inhibiendo su actividad enzimática. Sin embargo, FK506 es una molécula de gran tamaño y una porción de la misma queda excluida de este bolsillo (56). Asimismo, FK506 no es un inhibidor específico de FKBP52, sino que también inhibe la actividad PPIasa de otras FKBPs entre

las que se encuentran FKBP51 y FKBP12 (1). En consecuencia, es posible que la unión de FK506 a FKBP52 pueda generar impedimentos estéricos entre la región FK1 y otras proteínas interactuantes con FKBP52, o bien que el fenómeno observado en la Figura 1.2 sea consecuencia de la disminución de la actividad enzimática de otras proteínas con actividad de PPIasa. Teniendo en cuenta estas consideraciones, en el laboratorio del Dr. David Smith (*Mayo Clinic, Scottsdale, AZ*) se diseñaron dos mutantes puntuales de FKBP52 carentes de actividad de PPIasa: FKBP52 F67Y y FKBP52 F130Y, las cuales nos fueron generosamente provistas para este estudio. Ambas proteínas recombinantes están mutadas en aminoácidos conservados que son esenciales para la actividad enzimática de FKBP52, resultando en la pérdida de su actividad PPIasa (56).

En la Figura 1.3 se muestran los resultados de los ensayos de gen reportero para NF-κB realizados para grupos de células transfectadas con distintas cantidades de plásmidos de expresión para FKBP52 (FKBP52, 1µg), FKBP52 F67Y (FKBP52 F67Y, 0,1-1,0 µg), FKBP52 F130Y (FKBP52 F130Y 0,1-1,0 µg) o el vector vacío (vector, 1 µg) y tratados con PMA (100 ng/ml). La transfección con los plásmidos que codifican para las proteínas FKBP52 mutante provocó una disminución significativa (p≤0,001) de la actividad transcripcional de NF-κB inducida con PMA respecto del grupo FKBP52. También se observó una reducción en la actividad transcripcional estimulada con PMA en los grupos que sobreexpresan FKBP52 F67Y o FKBP52 F130Y respecto a las células transfectadas con el vector. Ambas proteínas mutantes mostraron efectos similares sobre la actividad transcripcional de NF-κB. Los resultados expuestos en la Figura 1.3, sugieren que la actividad PPlasa de FKBP52 resulta esencial para el efecto potenciador de esta FKBP sobre la actividad transcripcional de NF-κB.

En la Figura 1.4 se evaluó la consecuencia de co-transfectar a los plásmidos codificantes para mutantes inactivas de FKBP52 (FKBP52 F67Y 0,5 μ g o FKBP52 F130Y 0,5 μ g) con cantidades crecientes del vector de expresión para FKBP52 *wild type.* Los resultados permiten evidenciar que en la competencia de la expresión entre de estas proteínas se recupera la actividad de PPIasa ya que se observó una reversión significativa del efecto inhibitorio de las mutantes en la acción estimulante de FKBP52 sobre NF- κ B=

En su conjunto, los resultados de las Figuras 1.2 a 1.4 permiten postular que la actividad PPIasa de FKBP52 es necesaria para el efecto estimulante de esta inmunofilina sobre la actividad transcripcional de NF-κB. Ello sugiere que FK506 o drogas

equivalentes capaces de abolir la actividad enzimática de PPIasa de FKBP52 podrían ser utilizadas como inhibidoras indirectas de las acciones biológicas mediadas por NFκB.



Figura 1.3. Estudio del efecto de la actividad PPlasa de FKBP52 sobre la activación transcripcional de NF-κB mediante el uso de mutantes puntuales de FKBP52.

La actividad transcripcional fue determinada por el ensayo de gen reportero para NF- κ B mediante la medición de la actividad enzimática del gen luciferasa codificado en el vector reportero y normalizada con la actividad enzimática de β -galactosidasa (según sección Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional de NF- κ B ± ES para los distintos grupos. Los valores presentados fueron medidos en U.A, asignando 100 U.A. al tratamiento con PMA (100 ng/ml). Los grupos ensayados corresponden al tratamiento con PMA y a la transfección con plásmido codificante para FKP52 (1 µg) o distintas cantidades de vector de expresión para FKBP52 F67Y o FKBP52 F130Y (0,1 a 1,0 µg). Referencias: Significativo respeto al grupo tratado con PMA (**p≤0,001). Significativo respecto al grupo tratado con PMA que sobreexpresa FKBP52 (# p≤0,001).



a.



Figura 1.4 Efecto de la co-expresión de FKBP52 con FKBP52 F67Y o FKBP52 F130Y.

a. Actividad transcripcional de NF- κ B luego del tratamiento con PMA y la sobreexpresión de FKBP52 F67Y o FKBP52 F130Y (0,5 µg) con cantidades crecientes de plásmido codificante para FKBP52 (0, 0,5 o 1,0 µg). La actividad transcripcional fue determinada por el ensayo de gen reportero mediante la medición de la actividad enzimática del gen luciferasa codificado en el vector reportero para NF- κ B y normalizada con la actividad enzimática de β -galactosidasa (según sección Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional de NF- κ B ± ES en U.A, asignando 100 U.A. al tratamiento con PMA 100 (ng/ml) **b.** Ensayo de *Western blot* representativo del ensayo de gen reportero revelado con anti FKBP52.

Referencias: Significativo respecto al grupo con PMA (**p≤0,01) o respecto al grupo con PMA que sobreexpresa FKBP52 (#p≤0,001).

Efecto del dominio TPR de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF-κB.

Se ha determinado *in vitro* que FKBP52 tiene la capacidad de interactuar con Hsp70 así como con Hps90 a través de sus dominios TPR (51). En el modelo de activación de los receptores de esteroides en presencia del ligando, el receptor forma un heterocomplejo que retrotransporta al receptor vía dineína. El heterocomplejo es integrado por FKBP52, Hsp90, Hsp70 y p23. FKBP52 interactúa dentro de dicho complejo de forma directa con la chaperona Hsp90 a través de sus dominios TPR. Considerando este modelo de activación, se evaluó si el dominio TPR de FKBP52
interviene en la regulación de la actividad transcripcional de NF-κB. Con este propósito, se utilizó como vector de expresión de un péptido dominante negativo a un plásmido recombinante que codifica para un dominio TPR unido a la secuencia del octapéptido *flag.* Se realizaron los ensayos de gen reportero para NF-κB que se muestran en la Figura 1.5, donde se transfectó el plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52, 1µg) en presencia o ausencia del plásmido de expresión del péptido TPR-*flag* (0,05 o 0,25 µg). En células que sobreexpresan conjuntamente FKBP52 y el péptido TPR-*flag*, se observó una disminución significativa (p ≤ 0,01) de la actividad transcripcional respecto del grupo que sobreexpresa a FKBP52 solamente. Ello se debería a que la sobreexpresión del péptido TPR-*flag* podría desplazar a alguna proteína interactuante con los dominios TPR de FKBP52 (muy probablemente, las chaperonas Hsp90 y/o Hsp70), causando una disminución de la actividad transcripcional de NF-κB al desensamblarse el oligómero activador.

Efecto del dominio TPR sobre

a.







Figura 1.5. Efecto de la co-transfección del dominio TPR y de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF-κB.

La actividad transcripcional fue determinada mediante el ensayo de gen reportero con la medición de la actividad enzimática del gen luciferasa codificado en el vector reportero y normalizada con la actividad enzimática de β -galactosidasa (según sección Materiales y Métodos). **a.** Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional de NF- κ B ± ES para los diferentes tratamientos con PMA (100 ng/ml) y el plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52, 1µg) y/o con diferentes cantidades de plásmido *flag*-TPR (0,05 o 0,25 µg). Los valores graficados fueron medidos en U.A, asignando 100 U.A. al tratamiento con PMA. **b.** *Western blot* representativo de la sobreexpresión de FKBP52 y de *flag*-TPR revelado con anti FKBP52 y anti *flag*. Referencias: Significativo respecto al grupo tratado con PMA (**p ≤ 0,01).

La interacción FKBP52•Hsp90 ha sido extensamente estudiada. El laboratorio del Dr. David Smith también ha generado una mutante puntual de FKBP52, FKBP52 K354A, la que carece de capacidad de unión a Hps90 (52). En la Figura 1.6 se estudió el efecto de esta mutante sobre la actividad transcripcional de NF- κ B mediante el uso del ensayo de gen reportero. Se transfectaron células con el plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52, 1µg), FKBP52 K354A (FKBP52 K354A, 0,5 o 1 µg) o el vector vacío (vector, 1 µg) y se trataron con PMA (100 ng/ml). La sobreexpresión de FKBP52 K354A resultó en un descenso significativo (p≤ 0,05) de la actividad transcripcional de NF- κ B respecto del grupo FKBP52.

Las evidencias mostradas en las Figuras 1.5 y 1.6 sugieren que el dominio TPR de FKBP52 está involucrado en el efecto potenciador de la actividad transcripcional de NF- κ B. Por otro lado, la Figura 1.6 sugiere que la interacción Hps90•FKBP52 es relevante para la activación de NF- κ B. Es sabido que Hsp90 y Hps70 presentan el mismo dominio de interacción con proteínas TPR (EEVD), y no se conoce la capacidad de interacción entre FKBP52 K354A y Hps70 (51). De acuerdo con esto último, no se puede asegurar inequívocamente que la interacción directa de FKBP52 con Hps90 sea indispensable para los efectos observados con el experimento de la Figura 1.6.



Figura 1.6. Efecto de FKBP52 K354A sobre la actividad transcripcional de NF-κB.

La actividad transcripcional fue determinada por el ensayo de gen reportero mediante la medición de la actividad enzimática del gen luciferasa codificado en el vector reportero y normalizada con la actividad de β-galactosidasa (según sección Materiales y Métodos).

a. Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional de NF- κ B ± ES para células tratadas con PMA (100 ng/ml) y transfectadas con plásmido codificante para FKBP52 (FKBP52, 1µg), para FBP52 K354A (FKBP52 K354A, 0,5 o 1,0 µg) o vector vacío (vector, 1 µg). Los valores graficados fueron medidos en U.A, asignando 100 U.A. al tratamiento con PMA.

b. Ensayo de *Western blot* representativo de la sobreexpresión de FKBP52 y FKBP52 K354A revelado con anticuerpo anti FKBP52.

Referencias: Significativo respecto al grupo tratado con PMA (*p≤0,05 y **p≤0,01) y significativo respecto al grupo con PMA y que sobreexpresa FKBP52 (#p≤ 0,05).

Los ensayos de gen reportero antes mencionados proponen que FKBP52 es un modulador positivo de la actividad transcripcional de NF- κ B (Introducción y Figura 1.1) y que este efecto sería dependiente tanto de su actividad PPIasa (Figura 1.3 y 1.4), como de su dominio TPR (Figura 1.5 y 1.6). Además, el tratamiento con FK506 tiene la capacidad de inhibir el incremento de actividad transcripcional de NF- κ B generado por la sobreexpresión de FKBP52 en ensayos de gen reportero (Figura 1.2). De estas

observaciones se infiere que el macrólido FK506 podría ser un fármaco útil para inhibir farmacológicamente la acción de NF-κB. Con el objeto de estudiar el potencial rol de la actividad PPIasa de FKBP52 en su regulación de NF-κB, se utilizaron dos estrategias diferentes: la sobreexpresión de una mutante puntual en el dominio PPIasa (FKBP52 F130Y), y la inhibición de tal actividad enzimática por tratamiento de las células con FK506.

Estudio del efecto de FKBP52 sobre la fosforilación y la degradación de IkBa.

NF-κB se encuentra retenido en el citoplasma en ausencia de estímulo externo por la interacción con la subunidad inhibitoria IκB. En la vía canónica de activación de NFκB, el inhibidor IκBα se une con gran afinidad al dímero p65/p50 enmascarando la secuencia de localización nuclear. Ello mantiene al factor de transcripción inactivo en el citoplasma. La activación de NF-κB por diferentes estímulos desencadena la fosforilación de dos residuos de serina de IκBα por medio del complejo de quinasas IKK. La proteína IκBα fosforilada (p-IκBα), es sustrato de E3 ligasas para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S. La fosforilación y posterior degradación de IκBα son pasos clave en la activación del factor de transcripción [(78), sección Introducción].

Se evaluó el posible efecto de la sobreexpresión de FKBP52 sobre la fosforilación y la degradación de $I\kappa B\alpha$, dos hitos importantes en el encendido de la vía canónica de NF- κ B. En la Figura 1.6 se presentan los ensayos de *Western blot* y las cuantificaciones (densitometrías) correspondientes al análisis de la fosforilación y la degradación de $I\kappa B\alpha$. Se expresa la cantidad de proteína p- $I\kappa B\alpha$ o $I\kappa B\alpha$ total relativa a tubulina en función del tiempo de tratamiento con PMA (100 ng/ml) en grupos de células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52), FKBP52 F130Y (FKBP52 F130Y) o el vector vacío (vector).

La fosforilación de IκBα tiene lugar 5 minutos después de la estimulación de las células con PMA, y alcanza su máximo a los 15 minutos, para posteriormente decaer hasta el nivel basal después de 45 minutos de tratamiento. La densitometría de la Figura 1.6.b muestra la cuantificación de los ensayos de *Western blot* revelados con anticuerpo anti-p-IκBα Ser³². Del análisis de los resultados se desprende que los grupos FKBP52 y FKBP52 F130Y no presentan diferencias significativas (p>0,05) con el grupo de células transfectadas con el vector. En base a los resultados obtenidos, la sobreexpresión de

FKBP52 no parece incidir sobre la fosforilación de I κ B α en este tipo celular estimulado con PMA.

La degradación de $I\kappa B\alpha$ se evaluó por *Western blot* revelado con anticuerpo específico anti-I $\kappa B\alpha$ total. Los resultados de la Figura 1.6.a y b revelan que la degradación de I $\kappa B\alpha$ comienza alrededor de los 25 minutos post-tratamiento con PMA y luego de 45 minutos el 68 ± 9 % de I $\kappa B\alpha$ en el grupo vector se encuentra degradado. FKBP52 y FKBP52 F130Y no presentan diferencias significativas (p>0,05) en la cantidad de I $\kappa B\alpha$ en el tiempo 0 minutos de tratamiento con PMA (basal) respecto al basal del grupo vector. Tampoco hay disparidad en durante la degradación de I $\kappa B\alpha$ a lo largo del tiempo de incubación con PMA entre FKBP52, FKBP52 F130Y y el grupo vector. En función de estos resultados se podría postular que la sobreexpresión de FKBP52 no afectaría la cantidad de I $\kappa B\alpha$ basal ni su velocidad de degradación durante la activación de NF- κB con PMA.



b. Efecto de FKBP52 y FKBP52 F130Y sobre la fosforilación de lκB





Figura 1.6 Estudio del efecto de FKBP52 y FKBP52 F130Y en la fosforilación y degradación de $I_{\kappa}B\alpha$.

a. Ensayo de *Western blot* representativo donde se evalúa la fosforilación de I_KB α con anticuerpo anti-p-I_KB α y la degradación de I_KB con anticuerpo anti I_KB α total en función del tiempo (0, 5,15, 25, 35 y 45 minutos) de tratamiento con PMA (100 ng/ml) normalizado con anticuerpo anti tubulina para los distintos grupos de tratamiento: vector, FKBP52 y FKBP52 F130Y. La sobreexpresión de FKBP52 y FKBP52 F130Y se verificó con anticuerpo anti FKBP52.

b. Densitometría de 5 experimentos independientes de Western blot. Los resultados se expresan como promedio de p-lkB relativo a tubulina ± ES en función del tiempo de tratamiento con PMA para los tres grupos ensayados: vector, FKBP52 y FKBP52 F130Y.

c. Densitometría de 2 experimentos independientes de *Western blot*. Los resultados se expresan como promedio de IkB relativo a tubulina ± ES en función del tiempo de tratamiento con PMA para los tres grupos ensayados: vector, FKBP52 y FKBP52 F130Y.

Referencias. Grupos ensayados: [●] vector, **■** FKBP52, **●** FKBP52 F130Y.

Evaluación de p65 total y p65 fosforilada en Ser536.

La activación de NF- κ B en respuesta a estímulos externos conlleva la fosforilación de I κ B por el complejo IKK y su posterior degradación, así como también la fosforilación de las subunidades de NF- κ B en diferentes sitios. Las fosforilaciones en residuos serina y treonina de la subunidad p65 regulan su activación, y por tanto han sido largamente estudiadas. En particular, la fosforilación de p65 en la Ser536 dentro del dominio de transactivación es necesaria para la expresión de determinados genes regulados por NF- κ B y favorece la interacción de p65 con el factor general promotor de la transcripción TFIID 31 (110). Adicionalmente, esta modificación promueve en ciertos casos, el transporte retrógrado de p65 por un mecanismo independiente de la degradación de I κ B (111). La fosforilación de p65 en serina 536 es catalizada por diferentes proteínas quinasas entre las que se encuentran: IKK α/β , IKK ϵ , TBK1, RSK1 y CDK6, dependiendo del estímulo involucrado y del tipo celular (84, 112).

Con la finalidad de investigar el efecto de FKPB52 sobre la fosforilación de p65 en serina 536 (p-p65 Ser536) se efectuaron los ensayos de *Western blot* mostrados en la Figura 1.7. Las células fueron transfectadas con plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52) o con el vector vacío (vector) durante 48 horas, e incubadas con PMA (PMA, 100 ng/ml) o vehículo (basal) durante 16 horas adicionales. Se estudió la fosforilación de p65 con dos estrategias diferentes: mediante el revelado con anticuerpo anti-p65 sumado al tratamiento con fosfatasa alcalina, y mediante la detección con anticuerpo específico anti-p-p65 Ser536 por *Western blot*. Además, se evaluó con anticuerpo anti GAPDH el control de carga, y con anti-FKBP52 la sobreexpresión de la inmunofilina.

Capítulo 1

Con el anticuerpo anti-p65 total se detectaron tres bandas bien diferenciadas, las que frente al tratamiento con fosfatasa alcalina aumentaron su movilidad electroforética indicando la presencia de grupos fosfato en todas ellas. El tratamiento con fosfatasa modificó la movilidad de las bandas identificadas con anti-p65 total; a pesar de esto, el número de bandas detectadas se mantuvo constante luego de la desfosforilación. Es posible que, adicionalmente a los residuos fosforilados, existan otras modificaciones post-traduccionales o isoformas de p65 que den cuenta de las distintas bandas detectadas. Se conocen modificaciones post-traduccionales de p65 que incluyen la metilación, acetilación, sumoilación, y la ubiquitinación (113). A su vez, se han reportado cuatro isoformas de p65 en la base de datos Refseq de NCBI con diferente número de aminoácidos cada una: la isoforma 1 es la de mayor longitud y cuenta con 551 aa, la isoforma 2 con 548 aa, la isoforma 3 con 482 aa y la isoforma 4 con 448 aa. (*RefSeq Accession*: NM_021975.3, NM_001145138.1, NM_001243984., NM_001243985.1, respectivamente).

La incubación con fosfatasa alcalina (calles 2, 4, 6 y 8 Figura 1.7) también generó un cambio en la movilidad electroforética de la proteína FKBP52, tal como se observa con el anticuerpo anti-FKBP52 respecto de aquéllos lisados celulares no tratados con fosfatasa alcalina (calles 1, 3, 5, 7 Figura 1.7). De esta manera, se evidencia₇ la presencia de grupos fosfato en FKBP52 endógena (calles 1, 2, 5 y 6 Figura 1.7) y en FKBP52 expresada a partir del vector correspondiente (calles 3, 4, 7 y 8 Figura 1.7). La fosforilación de FKBP52 ha sido reportada con anterioridad y se ha identificado que la quinasa CKII es responsable de esta modificación post-traduccional (114).

Notablemente, la cantidad total de proteína p65 revelada con el anticuerpo anti p65, se modificó con los distintos tratamientos. La sobreexpresión de FKBP52 por sí sola (calle 3 Figura 1.7.a y b) representó un incremento significativo (p≤0,05) en la cantidad de proteína p65 total respecto a la condición vector basal (calle 1 Figura 1.7.a y b). El tratamiento con PMA también ocasionó un aumento significativo de los niveles proteicos de p65 total. Las células tratadas con PMA, tanto del grupo vector (calle 5 Figura 1.7.a y b) como de FKBP52 (calle 7 Figura 1.7.a y b), presentaron una mayor cantidad de p65 total respecto a la grupo vector basal (calle 1 Figura 1.7.a y b).

Los resultados observados mediante el revelado con anticuerpo específico anti-pp65 Ser536 mostraron semejanza con los encontrados con el anticuerpo anti-p65 total: se obtuvo un incremento en p-p65 Ser536 tanto para la condición vector PMA (calle 5 Figura 1.7.a) como para FKBP52 basal (calle 3 Figura 1.7.a) respecto a la condición vector basal (calle 1 Figura 1.7.a). El agregado de fosfatasa alcalina en las calles 2, 4, 6 y 8 de la Figura 1.7.a permite corroborar que la banda detectada con el anticuerpo antip-p65 Ser536 le corresponde a la proteína fosforilada.

En resumen, la sobreexpresión de FKBP52 por sí misma indujo un incremento de p65 y de p-p65 Ser536 comparable al que se observa luego del tratamiento con PMA durante 16 horas. Las evidencias anteriores indicarían, que la sobreexpresión de FKBP52 induciría no solamente mayores niveles de proteína p65, sino que, además, una mayor cantidad de su forma fosforilada.

La Figura 1.7.c recopila los datos de densitometría de los ensayos de *Western blot* revelados con anti-p-p65 Ser536 y anti-p65 para grupos de células transfectadas con el vector de expresión para FKBP52 (FKBP52) o el vector vacío (vector) en ausencia de estimulación con PMA (basal). Los valores se expresan como porcentaje promedio de proteína (p65 o p-p65 Ser536, según corresponda) relativo a la banda detectada con anticuerpo anti-GADPH. La sobreexpresión de FKBP52 provoca un incremento de p-p65 Ser536 basal de igual magnitud al observado sobre p65 total. A partir de los resultados se sugiere que el incremento de p-p65 Ser536 que resulta de la sobreexpresión de FKBP52 sería consecuencia del aumento en la cantidad de p65 total.

а.	1	2	3	4	5	6	7	8	
FKBP52	-	-	+	+	-	-	+	+	
PMA	-	-	-	-	+	+	+	+	
Fosfatasa alcalina	-	+	-	+	-	+	-	+	
anti-p65		-	-	-	-				
anti-p-p65 (Ser536)	witten	erninit	-	*	-	-		Querte	
anti-FKBP52	-	-	-	-	-	-	-	-	1.100001-11.20000
anti-GADPH							-	-	「たい」というで



Figura 1.7. Estudio de los niveles proteicos de p65 y p-p65 Ser536 luego de la sobreexpresión de FKBP52 y del tratamiento con PMA.

a. Western blot representativo de niveles totales de proteína p65. Niveles p-p65 Ser536 se detectaron con anticuerpo específico. Anticuerpo anti-FKBP52 verifica la sobreexpresión de la inmunofilina y anti-GADPH se utiliza como control de carga. Los grupos estudiados corresponde a: la sobreexpresión de FKBP52 (FKBP52) o a la transfección con el vector vacío, sin tratamiento adicional (basal), o luego de una incubación con PMA (PMA). Se transfectaron células con los vectores correspondientes durante 64 hs y luego se realizó la incubación con PMA (100 ng/ml) durante 16hs adicionales en los casos que correspondiese. Los lisados celulares fueron incubados en presencia o ausencia de fosfatasa alcalina para evidenciar la presencia de proteínas fosforiladas

b. Densitometría correspondiente a 6 experimentos independientes de Western blot revelados con anticuerpo antip65 total para los grupos transfectados con el plásmido de expresión de FKBP52 o el vector vacío, con o sin tratamiento con fosfatasa alcalina. Se grafica el valor porcentual promedio de proteína p65 total relativizado con anti-GADPH ± ES. Los resultados obtenidos de cada experimento fueron relativizados al basal considerado como p65/GADPH igual al 100%.

c. Densitometría de p65 total y p-p65 que compara los niveles de p65 con los niveles de p-p65 para células transfectadas con plásmido codificante para FKBP52 (FKBP52) o el vector vacío en condiciones sin PMA (basal). Los valores se expresan como porcentaje promedio de proteína (p65 o p-p65) relativo a anti-GADPH ± ES. Los resultados obtenidos para p65 fueron relativizados al tratamiento vector basal considerado como proteína/GADPH igual a 100%. Los resultados para p-p65 se relativizaron de igual manera al tratamiento vector basal.

Referencias. Significativo respecto a las células transfectadas con el vector vacío y en condición basal (*p≤0,05). Los grupos entre corchetes señalan los resultados no significativos.

117

Dado que en la Figura 1.7 se ha mostrado que la sobreexpresión de FKBP52 es suficiente para favorecer la acumulación de p65, se decidió evaluar si la transfección con el vector de expresión para FKBP52 induce la actividad transcripcional de NF- κ B en ausencia de estímulo activador (PMA o TNF- α). La determinación de la actividad transcripcional se realizó por ensayos de gen reportero luego de 48 post-transfección con la mezcla correspondiente para recrear las condiciones experimentales de la Figura 1.7. Los resultados de la Figura 1.8 mostraron que la sobreexpresión de FKBP52 no es suficiente para potenciar la actividad transcripcional de NF- κ B sin presencia de estimulación con agentes activadores. La acción estimulante de FKBP52 requiere de la actividad in del factor de transcripción.





Figura 1.8. Efecto de la sobrexpresión de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B en ausencia de estímulo activador.

La actividad transcripcional fue determinada por el ensayo de gen reportero mediante la medición de la actividad enzimática del gen luciferasa codificado en el vector reportero y normalizada con la actividad de β -galactosidasa (según sección Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional de NF- κ B ± ES para células tratadas con PMA (100 ng/ml) y transfectadas con plásmido codificante para FKBP52 (FKBP52, 1 o 1,5 µg) o el vector vacío (vector, 1 µg). Los valores graficados fueron medidos en U.A, asignando 100 U.A. al tratamiento con PMA.

Efecto de la actividad PPlasa de FKBP52 sobre los niveles proteicos de p65 total y p-p65 Ser536.

De similar manera a los experimentos de la Figura 1.7, se realizaron los ensayos de *Western blot* de la Figura 1.9 mediante la transfección del plásmido codificante para

FKBP52 (FKBP52), FKBP52 F130Y (FKBP52 F130Y) o el vector vacío (vector). La presencia de p65 y p-p65 Ser536 fue revelada con los correspondientes anticuerpos específicos. Las calles 1 a 4 de la Figura 1.9 a y b muestran resultados semejantes a las calles 1 a 4 de la Figura 1.7. Se observa un aumento en la cantidad de p65 y de p-p65 Ser536 en el grupo FKBP52 con respecto al grupo vector. En las calles 5 y 6 Figura 1.9 se muestran los resultados correspondientes a la sobreexpresión de FKBP52 F130Y. Tanto el *Western blot* de la Figura 1.9.a como la densitometría de la Figura 1.9.b, exponen que la sobreexpresión de FKBP52 F130Y induce un incremento en p65 total (122 \pm 20%) aunque no significativo (p>0,05) respecto al grupo FKBP52 (152 \pm 11%).

La cantidad de p-p65 Ser536 sigue un patrón similar a la de p65 total. En la Figura 1.9.c se exhibe que existe un incremento no significativo (p>0,05) de p-p65 Ser536 en las células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP52 F130Y respecto al grupo transfectado con vector vacío. Tampoco hay diferencias significativas (p>0,05) entre la cantidad de p-p65 Ser536 y p65 total para las células que sobreexpresan FKBP52 F130Y.

	1	2	3	4	5	6
FKBP52	-	-	+	+	-	-
FKBP52 F130Y	-	-	-	-	+	+
Fosfatasa alcalina	-	+	-	+	-	+
anti-p65				1		
anti-p-p65 (Ser536)		Marcall	J	-		B ernard
anti-FKBP52		-				
anti-GADPH	1	•	-		-	١

a.



Figura 1.9 Estudio de los niveles proteicos de p65 y p-p65 Ser536 en células que sobreexpresan FKBP52 F130Y.

a. Ensayo de *Western blot* representativo de niveles totales de proteína p65. Niveles p-p65 Ser536 se detectaron con anticuerpo específico. Anticuerpo anti-FKBP52 verifica la sobreexpresión de FKBP52 F130Y y anti-GADPH se utiliza como control de carga. Los tratamientos realizados corresponden a la transfección de plásmido de expresión para FKBP52, FKBP52 F130Y o vector vacío durante 72hs y a la incubación con o sin fosfatasa alcalina de los lisados celulares para evidenciar la presencia de proteínas fosforiladas

b. Densitometría correspondiente a 4 experimentos independientes de *Western blot* para células transfectadas con plásmido codificante para FKBP52 (FKBP52), FKBP52 F130Y (FKBP52 F130Y) o vector vacío (vector), y/o tratamiento con fosfatasa alcalina. Se grafica el valor porcentual promedio de proteína total de p65 relativizado con anti-GADPH ± ES. Los resultados obtenidos de cada experimento fueron relativizados al grupo vector considerado como p65/GADPH igual al 100%.

c. Densitometría de p65 total y p-p65 que compara los niveles proteicos de p65 con los de p-p65 Ser536 para células transfectadas con el vector de expresión para FKBP52 F130Y o vector vacío. Los valores se expresan como porcentaje promedio de proteína (p65 o p-p65) normalizado por anti-GADPH ± ES. Los resultados obtenidos de p65 fueron relativizados al grupo vector sin fosfatasa considerado como proteína/GADPH igual a 100%. Los resultados de p-p65 Ser536 se relativizaron de igual manera al grupo vector.

Referencias. Significativo respecto al grupo vector sin fosfatasa alcalina (**p≤0,01). ns: los grupos entre corchetes señalan resultados no significativos.

Evaluación temporal del efecto de FKBP52 sobre p-p65 Ser536.

Según los resultados obtenidos en los experimentos anteriores (Figura 1.7 y 1.9), se ha puesto en evidencia que luego de la sobreexpresión de p65, la p-p65 Ser536 basal aumenta en igual medida que los niveles proteicos de p65. Asimismo, se observó que la fosforilación de p65 es inducida por PMA luego de 16 horas. A pesar de este resultado, la fosforilación de p65 Ser536 es un evento que comienza unos pocos minutos después

de la estimulación de NF- κ B. Por consiguiente, en la Figura 1.10 se analiza la fosforilación de p65 entre los 0 y los 45 minutos post tratamiento con PMA (100 ng/ml).

Los resultados de la Figura 1.10.a corresponden a imágenes representativas de los ensayos de Western blot revelados con anticuerpo anti-p-p65 Ser536, anti-FKBP52 y anti-tubulina para grupos de células transfectadas con el vector de expresión para FKBP52 (FKBP52), FKBP52 F130Y (FKBP52 F130Y) o vector vacío (vector) en ausencia (basal) o en presencia de PMA (PMA, 100 ng/ml) durante los tiempos indicados (5 a 45 min). En la Figura 1.10.b se muestra la densitometría correspondiente a los ensayos de Western blot efectuados. Existe un incremento en la cantidad de p-p65 Ser536 relativa a tubulina luego del tratamiento con PMA (Figura 1.10.a y 1.10.b) en el grupo vector. En las Figuras 1.10.a y 1.9.b se observa que la sobreexpresión de FKBP52 provoca un aumento significativo (p≤0,01) de p-p65 Ser536 basal. Adicionalmente, se produce un incremento no significativo de p-p65 Ser536 basal luego de la sobreexpresión de FKBP52 F130Y respecto del grupo vector basal. El tratamiento con PMA para todos los tiempos evaluados no genera diferencias significativas entre los grupos FKBP52, FKBP52 F130Y y vector. La Figura 1.11 muestra las densitometrías de los ensayos de Western blot de la Figura 1.10 de la cantidad de p-p65 Ser536 basal para los grupos vector, FKBP52 y FKBP52 F130Y. Los resultados indican que hay un incremento significativo (p≤0,001) de p-p65 Ser536 que se correlaciona con el aumento de la sobreexpresión de FKBP52 respecto las células control transfectadas con el vector, y que dicho efecto no se consigue por la sobreexpresión de FKBP52 F130Y.

A partir de las Figuras 1.7 a 1.11 se puede inferir que la actividad PPlasa de FKBP52 modularía el incremento basal de p65 total y de p-p65 Ser536. En su conjunto, los resultados de las Figuras 1.7 a 1.10 sugieren que la sobreexpresión de FKBP52 no desencadena cambios en el grado de fosforilación de p65, sino que se incrementa la cantidad de p65 total provocando la consecuente acumulación p-p65 Ser536 en condiciones basales. El aumento de p65 total observado por la transfección con el vector de expresión para FKBP52 sería dependiente de su actividad PPlasa.



Figura 1.10. Estudio temporal del efecto de FKBP52 y FKBP52 F130Y en la fosforilación de p65 en Ser536.

a. *Western blot* representativo de la fosforilación de p65 (p-p65 Ser536) en función del tiempo de tratamiento con PMA (100 ng/ml; 0, 5,15,25,35 y 45 minutos) normalizado con tubulina para las distintas condiciones ensayadas: transfectado con plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52), FKBP52 F130Y (FKBP52F130Y) o el vector vacío (vector). La sobreexpresión de ambas FKBP, salvaje y mutante, se verificó con anticuerpo anti-FKBP52.

b. Densitometría de 6 experimentos independientes de *Western blot*. Los resultados se expresan como promedio de p-p65 relativo a tubulina ± ES en función del tiempo de tratamiento con PMA para las tres condiciones ensayadas, *i.e.* transfección con vector, FKBP52 o FKBP52 F130Y.

Referencias. Sobreexpresión de O vector, ■ FKBP52, ● FKBP52 F130Y. *significativo respecto a grupo vector basal (p≤0,05).



Figura 1.11. Comparación de los niveles de p-p65 Ser536 entre células que sobreexpresan FKBP52 o FKBP52 F130Y. Recopilación de densitometría de *Western blot* anti-p-p65 Ser536 (Figuras 1.7 y 1.8) para células transfectadas con el plásmido codificante para FKBP52 (FKBP52), FKBP52 F130Y (FKBP52 F130Y) o vector vacío (vector) en condiciones basales. Los valores se expresan como porcentaje promedio de proteína (p65 o p-p65) relativo a GADPH ± ES. Los resultados obtenidos fueron relativizados al grupo vector considerado como proteína/GADPH igual a 100%.

Referencias. Significativo respecto a vector (***p≤0,001).

Efecto de la sobreexpresión de FKBP52 y de su actividad PPlasa sobre el transporte nuclear de p65.

Otro de los eventos clave en la activación de NF-κB es el pasaje del citoplasma al núcleo luego de la fosforilación y degradación de su proteína inhibitoria. FKBP52 por su parte, es una chaperona con la capacidad de unir a la proteína motora dineína a través de su dominio PPlasa (53, 115). En el nuevo modelo de transporte de los receptores esteroidales, FKBP52 interactúa con el receptor con mayor afinidad luego de la unión del ligando al factor de transcripción. El intercambio de FKBP51 dentro del complejo chaperonas•receptor de esteroides por FKBP52 como consecuencia de la unión a hormona, permite el transporte del mismo a lo largo de la red de microtúbulos por la acción de dineína hasta el núcleo (38, 40, 57, 108).

Teniendo en consideración que FKBP52 regula la actividad transcripcional de NFκB, se decidió estudiar si existe similitud entre el transporte retrógrado de p65 y el de los receptores de esteroides como es el caso de GR, MR y PR. Con este fin, se trataron células Hek293T con TNF-α (10 ng/ml) para inducir el pasaje de p65 al núcleo. Se evaluó la localización nuclear de p65 por inmunofluorescencia indirecta y se asignó un puntaje a cada célula observada según el grado de localización nuclear del factor de transcripción. Los puntajes asignados corresponden a 0 si hay ausencia de p65 en el núcleo (localización enteramente citoplasmática) tal como se esquematiza en la Figura 1.12.a. El puntaje 3 indica localización completamente nuclear de p65, mientras que los puntajes 1 y 2 fueron asignados a situaciones intermedias, dónde p65 no se podía considerar ni nuclear ni citoplasmático, tal como se ejemplifica en la Figura 1.12.a. En la Figura 1.12.b se presentan imágenes representativas de las inmunofluorescencias indirectas realizadas con los grupos de células transfectados con plásmido codificante para FKBP52 (FKBP52), FKBP52 F130Y (FKBP52 F1130Y) o el vector vacío (vector) en función de los tiempos de tratamiento con TNF- α (0, 30 y 60 minutos). En verde se observa la marca correspondiente detectada con anti-p65, mientras que en rojo se revela a FKBP52 endógena o a FKBP52-F130Y, según corresponda. Las flechas blancas dentro de las imágenes identifican a las células que efectivamente incorporaron el plásmido y que sobreexpresan a la IMM adecuada para cada grupo (rojo), con su correspondiente detección de p65 (verde).

En la Figura 1.12.b se grafica el porcentaje de células con localización nuclear de p65 (puntaje 3) en función del tiempo de incubación con TNF- α . En el caso de las células transfectadas con FKBP52 o FKBP52 F130Y, solamente se consideraron en la cuantificación aquellas células que efectivamente sobreexpresaran estas FKBPs. En la totalidad de los grupos ensayados, vector, FKBP52 y FKBP52 F130Y, p65 se encuentra en el núcleo en el 70% de las células evaluadas a partir de los 30 minutos post-tratamiento. Luego de los 60 minutos con TNF- α , en los grupos vector y FKBP52 F130Y el porcentaje de células con localización nuclear disminuye. Sin embargo, para FKBP52, el porcentaje células con p65 nuclear se mantiene durante un tiempo más prolongado, al menos hasta los 90 minutos examinados. Los resultados indican diferencias significativas (p≤0,05) en la localización nuclear de p65 para células transfectadas con FKBP52 respecto de la condición vector y de FKBP52 F130Y entre los 60 y 90 minutos de tratamiento con TNF- α . Las células que sobreexpresan FKBP52 muestran una mayor retención nuclear de p65 respecto grupo vector y a FKBP52 F130Y. En los grupos vector y FKBP52 F130Y hay un incremento del porcentaje de células con localización de p65

intermedia (puntaje 1 y 2) a partir de los 60 minutos post tratamiento con TNF- α (datos no mostrados).

La Figura 1.12.c presenta el porcentaje de células con localización citoplasmática de p65 (puntaje 0) en función del tiempo de incubación con TNF- α . A partir de esta figura se encuentra que, en la mayor parte de las células, p65 deja de ser citoplasmático alrededor de los 30 minutos post- tratamiento con TNF- α , y que permanece de esta manera durante todo el tiempo ensayado (hasta los 90 minutos). No se descubrieron diferencias entre los diferentes grupos, vector, FKBP52 y FKBP52 F130Y en la localización citoplasmática de p65 a lo largo del tiempo.





a. Sistema de puntaje asociado al grado de localización nuclear de p65 (0 a 3). Los puntajes corresponden a: 0, completamente citoplasmático; 1 y 2, intermedio; 3, enteramente nuclear.

b. Imágenes representativas de inmunofluorescencias indirectas realizadas con anticuerpos anti p65 (verde) y anti FKBP52 (rojo) para células transfectadas con vector vacío (vector) que sobreexpresan FKBP52 (FKBP52) o FKBP52 F130Y (FKBP52 F130Y) y tratadas con TNF-α (10 ng/ml). Se muestran tiempos representativos del tratamiento con TNF-α correspondientes a 0, 30 y 60 minutos de exposición.

c. Cuantificación de inmunofluorescencias acorde al puntaje mostrado en la parte a. La figura corresponde a localización de p65 nuclear (puntaje 3). Se grafica el porcentaje promedio de células con localización nuclear de p65 \pm ES en función del tiempo de tratamiento con TNF- α (0 a 90 minutos).

d. Cuantificación de inmunofluorescencias indirectas según el sistema de puntaje descripto en el panel 'a'. La figura corresponde a localización de p65 citoplasmática o puntaje 0. Se grafica el porcentaje promedio de células con localización citoplasmática de p65 ± ES en función del tiempo de tratamiento con TNF- α (0 a 90 minutos).

Los niveles proteicos de p65 son regulados por ubiquitinación y degradación proteasomal.

resultados comentados anteriormente (Figura 1.7), indican Los que la sobreexpresión de FKBP52 es suficiente para estimular el aumento de los niveles de proteína p65. La cantidad de una proteína dada dentro de una célula es consecuencia del balance entre dos procesos contrapuestos, la síntesis de nueva proteína regulada a través de cambios en la transcripción del ARN mensajero (ARNm) codificante para dicha proteína y de la degradación de la proteína ya sintetizada. La bibliografía existente hasta el momento presenta escasa información acerca de la regulación de la expresión del gen RELA codificante para la proteína p65. Hay evidencia que la expresión de la subunidad p65 de NF-kB está regulada por dos factores: Sp1 y MDM2, (116), aunque ensayos CHIPseq para factores de transcripción generados por el consorcio del proyecto ENCODE muestran al menos 30 posibles factores de transcripción con sitio de unión en una región próxima al gen RELA y marca de histonas compatible con actividad transcripcional (117).

La proteína p65 es degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma, así como también por vía lisosomal (118). Pin-1, una inmunofilina de la subfamilia de las parvulinas con actividad PPIasa, presenta capacidad de inhibir la degradación proteasomal de p65 mediante un mecanismo que involucra la fosforilación de p65 en la treonina 254 y posiblemente también, la actividad PPIasa de Pin-1 (13). Debido a que Pin-1 forma parte de la familia de las IMMs y que tiene actividad PPIasa como FKBP52, se decidió analizar si FKBP52 tiene la capacidad de estabilizar a la proteína p65. Se estudió el tiempo de degradación de p65 mediante el ensayo de *Western blot* y la incubación con dos

inhibidores de la síntesis proteica, puromicina y cicloheximida para distintos tiempos ensayados. De los resultados obtenidos mostrados en la Figura 1.13 se concluye que el 50% de la proteína p65 se degrada luego de 20 horas de tratamiento con puromicina (1 µg/ml) (Figura 1.13.a v b), mientras que con cicloheximida (200 ng/ml) esto ocurre alrededor de las 8 horas post-incubación (Figura 1.13.c y d). En las Figuras 1.13. a y c se muestran los Western blot correspondientes a los ensayos de puromicina y cicloheximida revelados con anticuerpo anti-p65, mientras que en las Figuras 1.12.b y d se exponen los resultados de la densitometría correspondiente como el cociente entre p65 y GADPH en función del tiempo de incubación con puromicina o cicloheximida. Los resultados permiten concluir que p65 se degrada activamente en células Hek293T, aún en ausencia de estímulos externos como PMA o TNF-α, y que además este proceso es importante en el mantenimiento de la cantidad de proteína del factor de transcripción de la célula. A pesar de que el tratamiento con cicloheximida pareciera tener una mayor efectividad en la inhibición de la síntesis de p65, se ha reportado que esta droga también puede afectar la actividad PPlasa (1). Por tal motivo, priorizamos el uso de puromicina en el ensayo de la Figura 1.15.



Figura 1.13. Estudio de la degradación de p65.

Tiempo cicloheximida (horas)

a. Ensayo de *Western blot* para evaluar la disminución en los niveles de p65 luego del tratamiento con puromicina (1µg/ml) para diferentes tiempos de tratamiento con la droga (0 a 20 horas).

b. Densitometría del ensayo de puromicina. Los resultados se grafican como p65/GADPH en U.A en función del tiempo de tratamiento con puromicina, relativizados a la condición 0 horas puromicina con p65/GADPH al que se le asignó 1 U.A.

c. Ensayo de *Western blot* para evaluar la disminución de los niveles de p65 luego del tratamiento con cicloheximida para diferentes tiempos de tratamiento con la droga (0 a 20 horas).

d. Densitometría del ensayo de cicloheximida. Los resultados se expresan como cantidad de proteína p65/GADPH en U.A. en función del tiempo de tratamiento con cicloheximida, relativizados a la condición 0 horas cicloheximida a la que se le asignó p65/GADPH igual a 1 U.A.

El tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132, permite determinar si la degradación de p65 ocurre mediante la vía de ubiguitina-proteasoma. MG132 favorece la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas y la presencia una proteína poliubiquitinada se interpreta como que la misma es blanco de degradación por la maquinaria proteasomal (119, 120). Con la finalidad de determinar si la cantidad de proteína p65 es regulada mediante la degradación por la vía ubiquitina-proteasoma se realizó un ensayo de ubiquitinación para p65. El experimento consistió en la sobreexpresión de una proteína de fusión entre p65 y un *tag* de hemaglutinina (p65-HA), y la transfección con un vector codificante para la proteína ubiquitina acoplada al mismo tag (Ub-HA). Mediante la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-p65 (I) se identificó a p65 y se la presencia de Ub-HA mediante Western blot con un anticuerpo que reconoce el tag hemaglutinina (anti-HA) (Figura 1.14). Adicionalmente se realizó un control de especificidad de la inmunoprecipitación con un anticuerpo IgG no específico (NI). Como consecuencia de este ensayo, se evidencia la aparición de bandas de p65 poliubiquitinada (Poli Ub-HA p65) en la fracción I luego del tratamiento con MG132 (5µM) durante 24 horas. En virtud de los resultados obtenidos en los experimentos de las Figuras 1.13 y 1.14 se concluye que la proteína p65 es ubiquitinada y degradada por el proteasoma en células Hek293T en el tiempo estudiado.



Figura 1.14. Ensayo de ubiquitinación de p65. a. Western blot para evaluar la ubiquitinación de p65. Las células fueron transfectadas con plásmido codificante para Ub-HA y para p65-HA y/o tratadas con el inhibidor del proteasoma MG132 (5 μM) durante 24 horas para favorecer la acumulación de proteínas ubiquitinadas. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-p65 (I) o con anticuerpo IgG no específico (NI) y revelados para detectar la presencia de p65 con anticuerpo anti-p65 y la aparición de bandas de ubiquitinación con anticuerpo anti-HA. Se verificó la presencia de p65 y ubiquitina-HA en los lisados indicados como fracción total para células tratadas con y sin MG132.

Referencias. Las flechas negras indican las bandas de p65 poliubiquitinada (Poli Ub-HA p65) y de p65-HA según se indica sobre la figura. mk: macador de peso molecular.

Estudio de la estabilidad de p65 en células que sobreexpresan FKBP52.

Se mostró previamente en la Figura 1.7, que la sobreexpresión de FKBP52 favorece el incremento de los niveles proteicos de la subunidad p65. Es entonces posible que FKBP52 pueda tener un efecto inhibitorio sobre la degradación de p65, o bien ser un potenciador de la transcripción del ARNm de p65. En ambos casos, la sobreexpresión de FKBP52 mostraría un aumento en la cantidad de proteína p65 similar al observado en la Figura 1.7. El tratamiento con un inhibidor de la síntesis proteica permite discernir entre estas dos alternativas. No se puede utilizar cicloheximida ya que afecta la actividad enzimática de PPIasa, pero la puromicina sí posibilita evidenciar cambios en la expresión de p65 independientemente de las variaciones en los niveles del ARNm.

Con el propósito de dilucidar el mecanismo por el cual FKBP52 induce la acumulación de proteína p65, se efectuó un ensayo de puromicina similar al de la Figura 1.13.a, pero en este caso, para células transfectadas con el plásmido codificante para FKBP52 (FKBP52) o el vector vacío (vector) (Figura 1.15.a). Las células fueron

incubadas con la mezcla de transfección durante 48 horas, y posteriormente fueron tratadas durante 20 h con puromicina (1µg/ml). Ello generó una disminución de la cantidad de p65 total para los grupos vector y FKBP52. La disminución en los niveles proteicos de p65 por el tratamiento con puromicina fue de menor magnitud en el grupo FKBP52 comparado con el grupo vector (50% vs 70%). Esta diferencia entre ambos grupos tratados con puromicina insinúa que FKBP52 funcionaría como un inhibidor de la degradación de p65.

En la Figura 1.15.b se muestra el ensayo de Western blot de grupos de células cotransfectadas con plásmido codificante para p65-HA y con el plásmido de expresión de FKBP52 (FKBP52) o vector vacío (vector). Luego de 48 horas post-transfección, las células fueron tratadas con MG132 (5 µM) durante 24 h adicionales o con vehículo. El Western blot resultante fue revelado con anticuerpo anti-p65, anti-HA, anti-FKBP52 y anti-GAPDH como control de carga. El tratamiento con MG132 se tradujo en un aumento del nivel de proteína p65 tanto en las células control transfectadas con el vector como en las que sobreexpresan a FKBP52 respecto a las células tratadas con vehículo, indicando que p65 está sujeta a una degradación activa vía proteasoma en condiciones normales. El incremento de p65 luego del tratamiento con MG132 fue mayor para el grupo FKBP52 respecto al grupo vector. La sobreexpresión de FKBP52 generó un aumento en los niveles proteicos de p65 exógeno (detectado con anti-HA y con un PM calculado de 70kDa.). Como se describe en la sección Materiales y Métodos, el vector de expresión para p65-HA cuenta con un promotor constitutivo de secuencia nucleotídica diferente al promotor endógeno del gen RELA. A la luz de estos resultados, el efecto de FKBP52 sobre los niveles de proteína p65 probablemente sea consecuencia de una regulación a nivel de la degradación de p65 y no sobre la transcripción del ARNm de p65.



Figura 1.15. Estudio de la estabilidad de p65 luego de la transfección de FKBP52.

a. Ensayo de *Western blot* para evaluar la disminución en los niveles de endógenos de p65 ante la sobreexpresión de FKBP52 (FKBP52) luego del tratamiento de las células con puromicina. Las células fueron transfectadas durante 48 horas y luego tratadas con puromicina (1µg/ml) durante 20 horas adicionales. Los lisados celulares se evaluaron para la presencia de las proteínas de interés con anticuerpos anti-GADPH (control de carga), anti-p65 y anti-FKBP52. **b.** Ensayo de *Western blot* realizado para células transfectadas con los plásmidos de expresión para p65-HA y FKBP52 (FKBP52) o vector vacío (vector) durante 48 horas y tratadas posteriormente con MG-132 (5µM) durante 24 horas adicionales. Los lisados celulares fueron evaluados para la presencia de p65, FKBP52 y GADPH.

Expresión de genes regulada por NF-kB

Tal como se demostró en las Figuras 1.1 a 1.4 por ensayos de gen reportero, FKBP52 estimula la actividad transcripcional de NF- κ B de forma PPIasa-dependiente. Con el fin de estudiar si FKBP52 tiene además la capacidad de modular la transcripción de genes regulada por NF- κ B (121, 122) se realizaron ensayos de *qPCR*. Con este fin, se transfectaron células Hek293T con plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52), FKBP52 F130Y (FKBP52 F130Y) o el vector vacío (vector) y luego se trataron durante 4 horas en presencia de TNF- α (10 ng/ml) o ausencia (basal). Se evaluó con *primers* específicos la expresión del ARNm de MMP-9, Bax y de actina. Los niveles de ARNm de actina se utilizaron como control interno. Los resultados se muestran en la Figura 1.16 y se expresan en veces de inducción de ARNm de MMP-9 o Bax respecto al grupo vector tratado con TNF-α. Los valores fueron normalizados a la expresión de ARNm de actina y calculados según el método de doble delta CT ($\Delta\Delta$ CT, sección Materiales y Métodos). La Figura 1.16 evidencia que el grupo FKBP52 tratado con TNF-α presenta un incremento en la expresión de ARNm de MMP-9 y de Bax respecto del grupo vector tratado con TNF-α. El grupo FKBP52 F130Y tratado con TNF-α mostró una disminución en la expresión de ARNm de MMP-9 y de Bax en comparación con las células transfectadas con el vector codificante para FKBP52 y tratadas con TNF-α. Estos datos experimentales sugieren que FKBP52 regula positivamente la transcripción de genes blanco de NF- κ B luego de la estimulación con TNF- α , MMP-9 y Bax, en forma dependiente de su actividad PPIasa.



Expresión de ARNm de MMP-9 y Bax

Figura 1.16. Expresión ARNm de MMP-9 y Bax por *qPCR***.** La expresión de ARNm de MMP-9 y Bax fue evaluada por *qPCR* y normalizada con la expresión de ARNm de actina. Los resultados obtenidos se muestran como el promedio de veces de inducción de la expresión de ARNm normalizada \pm ES para células transfectadas con los plásmidos de expresión para FKBP52, FKBP52 F130Y o el vector vacío. Las veces de inducción de ARNm fueron determinadas por el método de $\Delta\Delta$ CT y calculada según 2^{-(CT gen blanco-CT actina)}TNF- α -(CT gen blanco-CT actina) como se detalla en la sección Materiales y Métodos.

Evaluación de la interacción de p65 con FKBP52 en células Jurkat

NF-κB tiene un rol crucial durante distintas etapas de la iniciación y progresión del cáncer. La acción de NF-κB está involucrada en la proliferación de células tumorales y en numerosas neoplasias hematológicas, así como en la supresión de la apoptosis y la estimulación de la angiogénesis, y en la inducción de la transición epitelio-mesenquimal que facilita la metástasis (78, 90). La línea celular Jurkat es una línea celular humana

establecida a partir de sangre periférica de un paciente con leucemia linfoblástica aguda. Las células Jurkat muestran características de linfocitos T CD3+ (123), y la actividad de NF- κ B puede ser inducida en estas células por diferentes estímulos entre los que se incluyen PMA, TNF- α , LPS, IL-1, entre otros.

Resultados previos ya comentados en la Introducción demostraron que existe interacción directa entre la subunidad p65 y FKBP52, lo cual fue demostrado con ambas proteínas purificadas [sección Introducción; (34)]. Dicha interacción se favorece por el tratamiento de células Hek293T con PMA. Con el propósito de determinar si la interacción de p65 con FKBP52 tiene lugar en células cancerosas y permite la regulación de NF-kB, se realizó un ensayo de co-inmunopreciptación en lisados de células Jurkat estimuladas o no. Se evaluó la posible interacción de p65 con FKBP52 y otras chaperonas normalmente asociadas a los receptores de esteroides frente a diferentes activadores de NF-κB. Para ello, las células fueron tratadas con PMA (100 ng/ml), TNFa (10 ng/ml), LPS (1 µg/ml) o con vehículo (control) durante 30 minutos y luego procesadas según el protocolo de inmunoprecipitación detallado en la sección Materiales y Métodos. Los lisados celulares se incubaron con el anticuerpo inmunoprecipitante antip65 (I), o bien con anticuerpo IgG no específico (NI). Se detectó la presencia de p65, FKBP52, Hsp70 y Hsp90 en los inmunoprecipitados y en las fracciones totales con anticuerpos específicos. La Figura 1.17 presenta la co-inmunoprecipitación de FKBP52 con p65 para el tratamiento control y con los distintos agentes estimulantes. En virtud de los resultados obtenidos, se puede determinar que existe un incremento en la cantidad de FKBP52 co-inmunoprecipitado en las condiciones tratadas con activadores de NF-κB respecto al control. No se logró recuperar a la chaperona de choque térmico Hsp90 en la fracción inmunoprecipitada, lo cual era esperable ya que similares resultados del grupo de trabajo se han obtenido con lisados de Hek293T (40). Los complejos de NF-κB no se vieron asociados a esta chaperona, aunque sí lo hicieron con Hsp70, también en hallazgos recientes realizados por otros grupos de trabajo (118). Adicionalmente, el tratamiento de las células con PMA, TNF-α o LPS no sólo favorece la interacción entre p65 y FKBP52, sino que también se recluta a Hsp70.

La ausencia de interacción entre Hsp90 y p65 también fue obtenida en ensayos de co-inmunopreciptación en la línea celular Hek293T (34). Los resultados obtenidos para los ensayos de gen reportero con la proteína mutante FKBP52 K354A presentados en la Figura 1.4 mostraron una disminución parcial de la actividad transcripcional de NF-κB

respecto de FKBP52 *wild type*. En relación con estos hallazgos, cabe aclarar que la mutante FKBP52 K354A no tiene capacidad de interactuar con Hsp90, pero se desconoce si pierde también la habilidad de unir a Hsp70. También podría ocurrir, que la mutante FKBP52 K354A pierda la interacción con Hsp90 y que esto afecte a cofactores transcripcionales reclutados a los sitios de transcripción, muchos de los cuales son proteínas TPR clientes de Hsp90 (48, 61).



Figura 1.17. Evaluación de la interacción de p65 con FKBP52 y proteínas de choque térmico (Hsps). Co-inmunoprecipitación de p65 con FKBP52 y Hsps en células Jurkat luego del tratamiento control (sin estímulo), con PMA (100 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) o LPS (1 mg/ml) durante 30 minutos. Se evaluó la presencia de p65, Hsp90, Hsp70 y FKBP52 en la fracción total y en los inmunoprecipitados incubados con anticuerpo anti p65 (I) y con anticuerpo IgG no específico (NI) para todos los tratamientos realizados.

Referencias. anti-p65 (M): anticuerpo anti-p65 isotipo ratón. anti-p65 (R): anticuerpo anti-p65 de isotipo de conejo. I: Inmunoprecipitación con anticuerpo específico anti-p65. NI: Inmunoprecipitación con anticuerpo no específico. La flecha negra indica la banda específica correspondiente a la proteína revelada por *Western blot*.

Efecto de FK506 sobre Metaloproteasa 9 en células Jurkat.

La Metaloproteasa 9 de Matriz extracelular (MMP-9) es una proteína con actividad de gelatinasa que es secretada al medio extracelular y su expresión es regulada por el factor de transcripción NF-κB (124). La acción de MMP-9 está involucrada en la angiogénesis, la migración celular y en la progresión de numerosos tumores, por lo que es un blanco farmacológico ampliamente estudiado en el tratamiento contra el cáncer. Se ha demostrado recientemente que, además, MMP-9 es relevante en la leucemia linfoblástica crónica debido a sus efectos sobre la migración celular y la apoptosis (125-127). En virtud de que las células Jurkat expresan en forma inducible tanto MMP-9 como MMP-2 (128), se decidió evaluar los niveles de MMP-9 en estas células. En la Figura 1.16 se demostró que la expresión de MMP-9 resultó ser dependiente de la actividad

PPlasa de FKBP52 y, por lo tanto, se decidió evaluar si el tratamiento con FK506 podía afectar la expresión de MMP-9 en células Jurkat.

Se trataron células Jurkat en presencia de TNF- α (10 ng/ml) durante 24 horas: Una parte de las células tratadas con TNF- α fueron adicionalmente pre-incubadas durante 1 hora con FK506 (0,5, 1 y 5 μ M). Los niveles proteicos de MMP-9 se analizaron por *Western blot*, tal como se muestra en la Figura 1.18. El tratamiento con TNF- α ocasionó un aumento en la cantidad de MMP-9 en comparación con la condición basal. El tratamiento con FK506 disminuyó los niveles de MMP-9 para todas las concentraciones evaluadas hasta niveles aún inferiores a los detectados para la condición basal.





Ensayo *Western blot* para MMP9 y GADPH de lisados totales de células Jurkat tratadas con distintas cantidades de FK506 (0,5 a 5 μ M) y con TNF- α (10 ng/ml). Células Jurkat fueron pre-incubadas durante 1 hora con FK506 luego tratadas con TNF- α durante 24 horas.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo permiten afirmar que FKBP52 es un regulador positivo de la actividad de NF- κ B y que su actividad PPIasa es clave en la activación del factor de transcripción. En particular, FKBP52 regula la acumulación de proteína p65 disminuyendo su degradación, la actividad transcripcional de NF- κ B y adicionalmente favorece la retención nuclear de p65. Además, se ha demostrado que la interacción entre FKBP52 y p65 no sería exclusiva de un modelo celular dado. Los resultados sugieren, además, que la droga FK506 podría ser utilizada para inhibir de manera indirecta los efectos biológicos de NF- κ B.

Capítulo 2:

Modulación de NF-κB por *FK506-binding protein* 51 kDa.

FKBP51 es una proteína perteneciente a la superfamilia de las IMMs, y a la subfamilia de las FKBPs o *FK506-binding proteins*. Al igual que FKBP52, FKBP51 es una FKBP de alto peso molecular. FKBP51 presenta con tres dominios estructurales: un dominio *N*-terminal FK1 con actividad peptidil-prolil isomerasa, un dominio intermedio FK2 sin actividad enzimática y un dominio *c*-terminal TPR con sitio de unión para la chaperona de choque térmico Hsp90. FKBP51 cuenta con un 70 % de similitud de secuencia y estructural conFKBP52 (108). A pesar de las similitudes estructurales con FKBP52, ambas proteínas suelen tener roles biológicos antagónicos. En el modelo de activación de los receptores de esteroides, FKBP52 potencia la activación transcripcional del receptor de glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), progesterona (PR) y andrógenos (AR) y también favorece su translocación nuclear (36, 38, 40, 57, 108). Por el contrario, FKBP51, es un inhibidor de la transcripción dependiente de GR y PR, y retrasa la localización nuclear de los receptores en presencia de hormona (36, 37, 40); con excepción del receptor de andrógenos, para el cual FKBP51 regula positivamente su acción (39, 59, 108).

Chen G., et. al.(106) fueron pioneros en reportar la interacción entre Hsp90 y el complejo de quinasas IKK encargadas de fosforilar a la proteína inhibitoria de NF- κ B, i κ B. Posteriormente, se determinó que Hsp90, la co-chaperona Cdc37 y FKBP51 participan de forma transitoria del complejo de quinasas IKK. Estas chaperonas y co-chaperonas son necesarias para la maduración y la activación de IKK (107). Otro grupo de investigación ha propuesto que FKBP51 afecta la acción de NF- κ B en células de melanoma, sugiriendo que existe una interacción entre IKK, FKBP51 y TRAF2, una proteína de señalización en la activación de NF- κ B río arriba de IKK [(105), sección Introducción].

Los resultados del Capítulo 1 demostraron que existe una regulación de NF-κB por FKBP52 de forma similar a lo reportado para los RE. Las evidencias anteriores en su

conjunto, así como la experiencia previa del laboratorio en el trabajo con chaperonas motivaron el estudio de la modulación de NF-κB por FKBP51.

Adicionalmente, resultados previos de nuestro laboratorio presentados en la sección Introducción en la línea celular de fibroblastos Hek293T que:

- 1- la sobreexpresión de FKBP51 tiene un efecto inhibitorio sobre la activación transcripcional de NF-κB.
- 2- FKBP51 retrasa la translocación nuclear de p65 en células estimuladas con PMA como se determinó por inmunofluorescencia indirecta.,
- 3- y que FKBP51 interactúa con p65 preferencialmente en ausencia de PMA, según demostrado por ensayos de co-inmunopreciptación.

Estos resultados proponen una posible acción inhibitoria de FKBP51 sobre la regulación de NF- κ B en este tipo celular, contraria a lo reportado en melanoma (31, 60, 105) y antagónica al efecto observado con FKBP52 para NF- κ B.

En este capítulo se abordarán los objetivos 1 a 5 de la sección Objetivos centrados en el rol de FKBP51 y sus diferentes dominios sobre la actividad de NF-κB. En resumen, se estudiará la acción de FKBP51 en diferentes pasos de la cascada de señalización de NF-κB y la contribución de su actividad enzimática sobre dicha regulación.

Evaluación de la actividad transcripcional de NF- κ B en respuesta a TNF- α

Los resultados comentados en la Introducción muestran que la sobreexpresión de FKBP51 inhibe la activación transcripcional de NF- κ B inducida por PMA. Por otro lado, en el capítulo I se determinó que la sobreexpresión de FKBP52 induce la activación transcripcional de NF- κ B estimuladas tanto con TNF- α como con PMA. En la Figura 2.1 se muestra el efecto de la sobreexpresión de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B por medio del ensayo de gen reportero en células estimuladas con TNF- α . Los resultados de actividad transcripcional fueron cuantificados según se detalla en la sección Materiales y Métodos, y expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Los valores de actividad transcripcional se relativizaron al grupo vector tratado con TNF- α (10 ng/ml), al cual se le asignó una actividad transcripcional de NF- κ B igual a 100 U.A. La sobreexpresión de FKBP51 presentó una inhibición significativa de la activación transcripcional de NF- κ B por TNF- α , de forma similar al efecto observado en células transfectadas con PMA presentado en la sección Introducción.



Efecto de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B con TNF- α

Figura 2.1. Efecto de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF-κB luego de la estimulación con TNF-α.

La actividad transcripcional de NF-κB fue determinada por el ensayo de gen reportero para NF-κB en células Hek293T a partir de la medición de la actividad enzimática codificada en el gen luciferasa normalizada con la actividad enzimática de β-galactosidasa (según sección Materiales y Métodos). Los resultados se expresan como el promedio de la actividad transcripcional de NF-κB ± ES para los grupos transfectados con el plásmido codificante para FKBP51 (FKBP51, 1µg) o con el vector vacío (vector, 1µg) y tratados con TNF-α (10 ng/ml) durante 6 horas. Los valores obtenidos se presentan en unidades arbitrarias (U.A.), asignando 100 U.A. al grupo transfectado con el vector vacío e incubado con TNF-α. Referencias: ** significativo respecto al grupo transfectado con vector vacío y tratado con TNF-α (p≤0,01).

Estudio del efecto de la actividad PPlasa de FKBP51 en la activación transcripcional de NF-κB.

El dominio FK1 de FKBP51 presenta alta homología de secuencia con el dominio FK1 de FKBP52, al igual que muestra actividad enzimática de PPIasa susceptible de ser inhibida por la droga FK506 (129). Dado que en los resultados presentados en el Capítulo I se evidenció que la actividad enzimática de PPlasa de FKBP52 tiene un rol central en la activación de NF-κB, se decidió evaluar si la actividad PPIasa de FKBP51 podría tener efecto sobre este mismo evento. Con este objetivo se utilizaron dos estrategias diferentes, las células fueron tratadas con FK506, un, o bien transfec tadas con el plásmido codificante para una doble mutante puntual de FKBP51 sin actividad enzimática (FKBP51 FD67/68DV).

En la Figura 2.2 se evaluó el efecto de FK506 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B por ensayos de gen reportero en células transfectadas con el vector de expresión para FKBP51 (FKBP51, 1 μ g) o con el vector vacío (vector, 1 μ g), y/o pre-incubadas con FK506 (1 μ M) durante 30 minutos I tratamiento cocon PMA (100 ng/ml) durante 6 horas adicionales. Los resultados indican que el tratamiento con FK506 no modifica la acción inhibitoria de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B, sugiriendo que la actividad enzimática de PPIasa de FKBP51 no participa en esta regulación. De igual forma, los resultados de la Figura 2.3 muestran que la sobreexpresión de una doble mutante puntual de FKBP51 sin actividad PPIasa (FKBP51 FD67DV, 0,5 – 1,0 μ g) no presenta diferencias significativas respecto a la condición transfectada con FKBP51 *wild type*. En la Figura 2.3.b se presenta un *Western blot* representativo del ensayo y la sobreexpresión de FKBP51. El anticuerpo utilizado anti-FKBP51 permite la detección de FKBP51 *wild type*, pero no así de la mutante. Aunque la proteína FKBP51 FD67DV no puede ser detectada por este método, , aunque es sí es posible evidenciar su efecto sobre la activación transcripcional de NF- κ B.

Las resultados presentados en Figuras 2.2 y 2.3 llevan a concluir que la actividad de PPIasa FKBP51 no es necesaria paradel efecto inhibitorio de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF-κB. Esto presenta una diferencia sustancial respecto a lo observado mediante la sobreexpresión de FKBP52, donde su actividad enzimática sí era indispensable en la regulación del factor de transcripción. Los rsugierenel uso del macrólido no tendría efecto sobre FKBP51. La acción inhibitoria de FK506 reportada en el Capítulo 1 con células que sobreexpresan FKBP52 no tendría como blanco la actividad PPIasa de FKBP51, sino la de FKBP52.



Efecto de FK506 FKBP51 en la actividad transcripcional de NF-κB

Figura 2.2. Estudio del efecto FK506 sobre la inhibición en la actividad transcripcional de NF-κB mediada por FKBP51.

La actividad transcripcional fue determinada por el ensayo de gen reportero mediante la medición de la actividad enzimática del gen luciferasa codificado en el vector reportero y normalizada con la actividad de β -galactosidasa (según Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresan en U.A. como el promedio de actividad transcripcional ± ES, asignando 100 U.A. a la condición tratada con PMA y transfectada con el vector vacío. Las células fueron transfectadas con el plásmido codificante para FKBP51, o el vector vacío y/o tratadas con FK506 (1µM) durante 30 minutos, previo a una incubación con PMA (100 ng/ml) durante 6 horas adicionales.

Referencias: Significativo respecto a las células que sobreexpresan FKBP51 y fueron tratadas PMA (* p≤0,05). ns: no significativo respecto células que sobreexpresan FKBP51 tratadas con PMA.





Figura 2.3. Estudio del efecto de la actividad de PPlasa de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF-κB con una doble mutante puntual de FKBP51.

La actividad transcripcional fue determinada por el ensayo de gen reportero mediante la medición de la actividad enzimática de luciferasa codificada en el vector reportero y normalizada con la actividad de β -galactosidasa (según Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional ± ES en U.A., asignando 100 U.A. a la condición transfectada con el vector vacío y tratada con PMA. Las células fueron transfectadas con el vector de expresión para FKBP51 (FKBP51, 1µg), FKBP51 FD67/68DV (0,5 – 1,0 µg) o el vector vacío (vector, 1µg) y tratadas con PMA (100 ng/ml).

Referencias: * significativo respeto a células tratadas con PMA que sobreexpresan FKBP51 (p≤0,05). ns: no significativo respecto a células tratadas con PMA que sobreexpresan FKBP51.

Efecto del dominio TPR de FKBP51 sobre la activación transcripcional de NF-KB.

A pesar de la alta similitud estructural entre FKBP51 y FKBP52, la orientación y apertura de los dominios TPR de ambas proteínas constituye la principal diferencia entre ambas [sección Introducción, (108)]. Experimentos con proteínas quimeras demostraron que los dominios TPR de FKBP51 y FKBP52 son funcionalmente intercambiables para la regulación de GR, no así los PPIasa que son los responsables de la identidad funcional de cada IMM [sección Introducción, (57, 108)]. Los dominios TPR de FKBP51 también

Capítulo 2

conforman una región de unión a la chaperona Hsp90, y esta unión es necesaria para la formación de complejos con PR (37). Estudios previos sobre NF- κ B y Hsp90, proponen a FKBP51 como parte de un complejo entre las quinasas IKK, Hsp90 y Cdc37 [Sección Introducción, (105-107)]. El dominio TPR de FKBP51 y su capacidad de unión a Hsp90 resultaron de importancia tanto en el modelo de activación de los receptores de esteroides, como para la interacción reportada con el complejo de quinasas IKK. Por tal motivo, en el presente trabajo se evaluó el posible efecto de la interacción entre FKBP51 y Hsp90 sobre la acción inhibitoria de esta IMM sobre NF- κ B. Se utilizaron dos estrategias diferentes: la sobreexpresión de una mutante puntual de FKBP51 sin capacidad de unión a Hsp90 (brindada generosamente por el Dr. David Smith, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ), FKBP51 K352A (52), y la transfección con un plásmido recombinante que codifica para un dominio TPR unido a la secuencia del octapéptido *flag.*

En la Figura 2.4 se presenta el ensayo de gen reportero para la actividad transcripcional de NF- κ B en células que sobreexpresan FKBP51 K352A (FKBP51 K352A, 0,1, 0,5 o 1 μ g) o el vector vacío (vector, 1 μ g) y tratadas con PMA. La sobreexpresión de FKBP51 K352A (1 μ g) presenta una inhibición de la activación transcripcional de NF- κ B significativa respecto al tratamiento con PMA, y comparable a la observada con FKBP51 *wild type* (Figura 2.3 y 2.5). En base a estos resultados podemos proponer que la unión entre FKBP51 y Hsp90 no resulta necesaria para el efecto inhibitorio de FKBP51 sobre la activación transcripcional del factor de transcripcion.



Figura 2.4. Efecto de FKBP51 K352A sobre la actividad transcripcional de NF-ĸB.

a. La actividad transcripcional fue determinada por el ensayo de gen reportero mediante la medición de la actividad enzimática del gen luciferasa codificado en el vector reportero y normalizada con la actividad de β -galactosidasa (según Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional ± ES en U.A, asignando 100 U.A. al grupo transfectado con el vector vacío y tratado con PMA. Las células fueron transfectadas con el vector codificante para FKBP51 K352A (0,1, 0,5 o 1,0 µg) o el vector vacío y tratadas con PMA (100 ng/ml) durante 6 horas.

b. Western blot representativo del ensayo de gen reportero y de la sobreexpresión de FKBP51 K352A. Referencias: * significativo respecto a células transfectadas con el vector vacío y tratadas con PMA (p≤0,05).

En la Figura 2.5 se presenta el ensayo de gen reportero correspondiente a la cotransfección con el vector recombinante para el dominio TPR (*flag*-TPR) y el plásmido de expresión para FKBP51. La sobreexpresión del péptido *flag*-TPR resultó en una pérdida del efecto inhibitorio de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B, indicando que el péptido recombinante podría competir con proteínas con dominios TPR e influir de esta forma sobre la regulación de NF- κ B.
En su conjunto, los resultados de las Figura 2.4 y 2.5 se sugieren que la acción de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B no depende de su capacidad de unión a Hsp90, pero sí que el dominio TPR es capaz de interrumpir alguna interacción relevante en la vía de señalización de NF- κ B. Sin embargo, es necesario también considerar que la transfección con péptido *flag*-TPR podría no solo interrumpir la interacción entre FKBP51 y Hsp90, sino también la interacción de las chaperonas Hsp70 y Hps90 con otras proteínas con dominios TPR. Si bien FKBP51 presenta mayor afinidad por Hsp90 *in vitro*, también exhibe capacidad de unión con Hsp70 (sección Introducción), y la sobreexpresión del péptido *flag*-TPR podría también irrumpir esta interacción.



Figura 2.5. Efecto de la co-transfección del dominio TPR y FKBP51 sobre la activación transcripcional de NF- κ B.

a. La actividad transcripcional fue determinada por el ensayo de gen reportero mediante la medición de la actividad enzimática de luciferasa codificada en el vector reportero y normalizada con la actividad de β -galactosidasa (según Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresan como el promedio de actividad transcripcional ± ES en U.A., asignando 100 U.A. a las células transfectadas con el vector vacío y tratadas con PMA. Las células fueron

transfectadas con plásmido codificante para FKBP51 (FKBP51, 1µg) o el vector vacío (vector, 1µg) y el plásmido recombinante para el péptido *flag*-TPR (0,05 o 0,25 µg) en presencia de PMA (100 ng/ml).

b. Western blot representativo del ensayo de gen reportero revelado con anticuerpo anti-*flag.* Referencias: Significativo respecto a células que sobreexpresan FKBP51 y tratadas con PMA (* $p \le 0,05$).

Estudio del efecto de FKBP51 sobre la fosforilación y degradación de IkBa.

La fosforilación y degradación de I κ B α son dos eventos clave en la activación de la vía canónica de NF- κ B. Tal como se explicó previamente en las sección Introducción y en el Capítulo 1, la activación de NF- κ B por diferentes estímulos desencadena la fosforilación de I κ B α por el complejo de quinasas IKK. La fosforilación de I κ B α (p-I κ B α), convierte a la proteína I κ B α en sustrato de E3 ligasas para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S. La degradación de I κ B α libera al heterodímero p65/p50 para translocar al núcleo y regular la transcripción de los genes de respuesta κ B.

Dado que FKBP51 fue reportada como una de las proteínas interactuantes con IKK [sección Introducción, (106)], se estudió si la sobreexpresión de FKBP51 podía tener algún efecto en la fosforilación y en la degradación de la proteína inhibitoria IκBα. En la Figura 2.6 se presentan los ensayos de *Western blot* y las cuantificaciones (densitometrías) correspondientes para la fosforilación y la degradación de IκBα en células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector). Se expresa la cantidad de proteína p-IκBα o IκBα total relativa a tubulina en función del tiempo de tratamiento con PMA (100 ng/ml).

La fosforilación de $I \kappa B \alpha$ alcanza su máximo luego de 15 minutos de tratamiento con PMA, para posteriormente decaer hasta el nivel basal después de 45 minutos de tratamiento. La densitometría de la Figura 2.6.b muestra la cuantificación de los ensayos de *Western blot* revelados con anticuerpo anti-p-I $\kappa B \alpha$ Ser3. Del análisis de los resultados se desprende que la sobreexpresión de FKBP51 no genera diferencias significativas (p>0,05) en la fosforilación de I $\kappa B \alpha$ respecto de las células transfectadas con el vector para los tiempos de tratamiento con PMA evaluados. La degradación de I $\kappa B \alpha$ se evaluó por *Western blot* revelado con anticuerpo específico anti-I $\kappa B \alpha$ total. Los resultados de la Figura 2.6.a y b revelan que la degradación de I $\kappa B \alpha$ a lo largo del tiempo de incubación con PMA no presentaría diferencias entre los grupos de células transfectadas con el vector de expresión para FKBP51 y con el vector vacío.



Figura 2.6 Estudio del efecto de FKBP51 en la fosforilación y degradación de IkB.

a. Western blot representativo de la fosforilación de I κ B (p-I κ B) y la degradación de I κ B (I κ B) en función del tiempo de tratamiento con PMA (100 ng/ml). Las células fueron transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 o el vector vacío y tratadas con PMA durante 0, 5,15, 25, 35 y 45 minutos. El ensayo de Western blot fue revelado con anticuerpos anti-FKBP51, anti-p-I κ B α , anti-I κ B α y anti-tubulina.

b. Densitometría correspondiente a 2 experimentos independientes de *Western blot* revelados con anticuerpo anti-p-I κ Ba Ser³². Los resultados se expresan como porcentaje promedio de p-I κ B relativo a tubulina ± ES en función del tiempo de tratamiento con PMA (0, 5, 15, 25, 35 y 45 min) para células que sobreexpresan FKBP51 o transfectadas con el vector vacío (vector), asignando 100% de p-I κ Ba Ser32/tubulina a células transfectadas con el vector y sin tratamiento con PMA (0 min).

c. Densitometría correspondiente a los ensayos *Western blot* revelados con anticuerpo anti-I_kB α . Los resultados se expresan como promedio de I_kB relativo a tubulina ± ES en función del tiempo de tratamiento con PMA para células que sobreexpresan FKBP51 o transfectadas con el vector vacío, asignando 100% de I_kB α /tubulina a células transfectadas con el vector y sin tratamiento con PMA (0 min).

Sobreexpresión de FKBP51, O Transfección de vector vacío.

Evaluación de p65 total y p65 fosforilada en Ser536.

La fosforilación y degradación de p65 son dos eventos que pueden ser regulados dentro la vía de señalización de NF-kB. Como se mencionó previamente en el Capítulo I y en la sección Introducción, la fosforilación de p65 en Ser536 (p-p65 Ser536) regula la expresión de ciertos genes blanco de NF-kB, favorece la interacción de p65 con el factor general promotor de la transcripción TFIID 31 (110), y también participa de un mecanismo de translocación de p65 independiente de IkB (111). La fosforilación p-p65 Ser536 puede ser catalizada por diferentes proteínas guinasa entre las que se encuentran: ΙΚΚα/β, ΙΚΚε, TBK1, RSK1 y CDK6 (84, 112). Por otro lado, los niveles de p65 pueden ser regulados tanto a nivel de la transcripción del gen RELA, como por la degradación de la proteína ya sintetizada. Los resultados del Capítulo I demostraron que p65 puede ser degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma, y que la sobreexpresión de FKBP52 induce un aumento en los niveles de p65 total, posiblemente por estabilización de la proteína p65. Además, se determinó que la sobreexpresión de FKBP52 induce un incremento no solo de proteína p65 total, sino también un aumento proporcional de p-p65 Ser536. Ambos incrementos, en p65 total y p-p65, son modulados por la actividad PPlasa de FKBP52.

Teniendo en cuenta el efecto antagónico que tienen FKBP51 y FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF-κB, en la Figura 2.7 se decidió evaluar la posible acción de FKBP51 sobre los niveles de p65 total y p-p65 Ser536 por medio de ensayos de *Western blot* con anticuerpos específicos. Las células fueron transfectadas con el plásmido codificante para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío durante 72 horas, y los lisados celulares fueron incubados con fosfatasa alcalina (sección Materiales y Métodos). De manera similar a lo realizado en el Capítulo I, se estudió la fosforilación de p65 con dos estrategias diferentes: mediante el revelado con anticuerpo anti-p65 sumado al tratamiento con fosfatasa alcalina, y mediante la detección con el anticuerpo específico anti-p-p65 Ser536 por *Western blot*. Además, se utilizó el revelado con anticuerpo anti-GAPDH como control de carga, y con anti-FKBP51 se evaluó la sobreexpresión de la IMM.

El tratamiento con fosfatasa alcalina permitió identificar la presencia de proteínas fosforiladas mediante la modificación de su movilidad electroforética. Mediante el revelado con anticuerpo anti-p65 y el tratamiento con fosfatasa alcalina se identificaron bandas con una movilidad electroforética similar a lo reportado en el Capítulo 1, arribando

a una conclusión equivalente: existen formas fosforiladas de p65 evidenciadas por el tratamiento con fosfatasa alcalina, así como también es posible que éstas coexistan con otras modificaciones post-traduccionales o isoformas de p65. En las condiciones ensayadas, el revelado con anticuerpo anti-FKBP51 no detectó la presencia de formas fosforiladas de FKBP51, tanto de la proteína endógena como de la transfectada.

Los *Western blots* de la Figura 2.7.a y sus densitometrías en la Figura 2.7.b muestran que, a diferencia de lo que ocurre con FKBP52, la sobreexpresión de FKBP51 no tiene un efecto significativo sobre los niveles totales de proteína p65 ni sobre los niveles de p-p65 Ser536. Los resultados de la Figura 2.7.b se expresan como porcentaje promedio de proteína p65 relativo a GADPH ± ES. En la Figura 2.7.c se comparan los niveles de p-p65 y p65 total para células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 o el vector vacío. Los resultados indican que no hay diferencias significativas entre los niveles de p-p65 Ser536 ni p65 total entre las células que sobreexpresan FKBP51 y células transfectadas con el vector vacío.

a.





Figura 2.7 Estudio de los niveles totales de proteína p65 y p-p65 Ser536 luego de la sobreexpresión de FKBP51.

a. Western blot representativo de los niveles totales de proteína p65 revelados con anticuerpo anti-p65 y de p65 fosforilada con anticuerpo anti p-p65 Ser536. El anticuerpo anti-FKBP51 verifica la sobreexpresión de la inmunofilina y anti-GADPH se utiliza como control de carga. Los tratamientos realizados corresponden a la transfección con el plásmido codificante para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío durante 72 horas. Los lisados celulares fueron incubados en presencia o ausencia de fosfatasa alcalina para evidenciar la presencia de proteínas fosforiladas (sección Materiales y Métodos).

b. Densitometría correspondiente a 3 experimentos independientes de *Western blot* para células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o vector vacío, con o sin tratamiento con fosfatasa alcalina. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de proteína total de p65 relativizado con GADPH ± ES, asignando 100% a las células transfectadas con el vector vacío.

c. Densitometría correspondiente a los ensayos de *Western blot* representados en las Figuras 2.7.a y b, revelados con anti-p65 y anti-p-p65 Ser536 que compara entre los niveles de p65 y p-p65 Ser536 para células transfectadas con plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío. Los resultados se expresan como porcentaje promedio de proteína (p65 o p-p65 Ser536) relativo a GADPH ± ES, asignando un valor de proteína/GADPH igual a 100% para células transfectada con el vector vacío, tanto para la proteína p65 como p-p65 Ser536.

Evaluación temporal del efecto de FKBP51 sobre la fosforilación de p65 en Ser536.

En el Capítulo I se estudió el efecto de la sobreexpresión de FKBP52 sobre la fosforilación de p65 Ser536 a lo largo del tiempo luego del tratamiento con PMA. De forma análoga, aquí estudiamos la fosforilación de p65 en Ser536 luego del tratamiento con PMA. En la Figura 2.8.a se presentan los ensayos de *Western blot* correspondientes al estudio de la fosforilación de p65 en Ser536 entre 0 y 45 minutos post-tratamiento con PMA (100 ng/ml) para células transfectadas el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector). En la Figura 2.8.b se muestra la cuantificación

correspondiente a dichos ensayos. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de la cantidad de proteína p-p65 Ser536 relativa a tubulina en función del tiempo de incubación con PMA (5, 15, 25, 35, 45 min) o con vehículo (basal). Del análisis de los resultados se desprende que la sobreexpresión de FKBP51 no genera cambios significativos en los niveles basales de p-p65 Ser536 y tampoco en respuesta a la estimulación con PMA respecto del grupo transfectado con el vector vacío. La fosforilación de p65 en Ser536 no sería un evento regulado por la sobreexpresión de FKBP51 en este tipo celular.



Figura 2.8 Estudio temporal del efecto de FKBP51 sobre la fosforilación de p65 en Ser536.

a. Western blot representativo de la fosforilación de p65 (p-p65 Ser536) revelado con anticuerpo anti-p-p65 Ser536 para células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector) y tratadas con PMA (100 ng/ml; 5,15,25,35 y 45 minutos) o con vehículo. Los resultados se expresan como porcentaje promedio de p-p65 Ser536 relativo a tubulina ± ES, asignando un valor de p-p65 Ser536 igual a 100% para las células transfectadas con el vector vacío e incubadas con vehículo. La sobreexpresión de FKBP51 se verificó con un anticuerpo anti-FKBP51. **b**. Cuantificación correspondiente a 6 experimentos independientes de *Western blot*. Los resultados se expresan como promedio de p-p65 relativo a tubulina ± ES en función del tiempo de tratamiento con PMA para células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector).

Referencias. Sobreexpresión de O vector y FKBP51.

Efecto de FKBP51 sobre la translocación nuclear de p65.

El transporte retrógrado de NF-κB que ocurre luego de la degradación de IκBα permite la interacción del factor de transcripción con secuencias de respuesta κB en el ADN y por lo tanto la transcripción de genes blanco de NF-κB. Está reportado que tal mecanismo involucra a la proteína motora dineína. A diferencia de FKBP52, FKBP51 no tiene la capacidad de interactuar con esta proteína motora. En el modelo propuesto para los receptores de esteroides, FKBP51 forma parte de los complejos con el factor de transcripción sólo en ausencia de hormona. La activación del receptor por la unión del esteroide favorece el intercambio de FKBP51 por FKBP52 dentro del complejo RE•Hsp90, favoreciéndose así la rápida translocación al núcleo a través del transporte activo a lo largo de la red de microtúbulos por acción de la dineína. FKBP51 retiene a los receptores de esteroides en el citoplasma en ausencia de estímulo [sección Introducción, (35, 36, 108)].

En el caso de NF-κB, en el Capítulo I se demostró que FKBP52 favorece la retención nuclear de p65 luego del tratamiento con TNF-α en forma PPlasa dependiente. En la Figura 2.9 del presente Capítulo se evalúa el efecto de la sobreexpresión de FKBP51 en células Hek293T sobre la localización nuclear de p65. Células Hek293T fueron tratadas con 10 ng/ml de TNF-α para inducirn el pasaje de NF-κB al núcleo. Se evaluó la localización nuclear de p65 por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo específico para p65 y se asignó un puntaje a cada célula observada según el grado de localización nuclear del factor de transcripción. Los puntajes asignados corresponden a 0 si hay ausencia de p65 en el núcleo (localización enteramente citoplasmática) tal como se esquematiza en la Figura 2.9.a. El puntaje 3 indica localización completamente nuclear de p65, mientras que los puntajes 1 y 2 fueron asignados a situaciones intermedias, dónde p65 no se podía considerar ni nuclear ni citoplasmático, tal como se ejemplifica en la Figura 2.9.a. En la Figura 2.9.b se muestran imágenes representativas de las inmunofluorescencias indirectas realizadas para células transfectadas con plásmido codificante para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector) para algunos de los tiempos de tratamiento con TNF-α ensayados (0, 30 y 60 minutos). En verde se observa marcación correspondiente a p65, mientras que en rojo se evidencia la marca obtenida con anticuerpo específico contra FKBP51. Las flechas blancas dentro de las imágenes señalan a las células que efectivamente sobreexpresan FKBP51 (rojo), con su correspondiente marca de p65 (verde).

Capítulo 2

En la Figura 2.9.b se representa el porcentaje promedio de células con localización nuclear de p65 (puntaje 3) en función del tiempo de incubación con TNF- α . En el caso de las células transfectadas, únicamente se consideraron en la cuantificación aquellas células que efectivamente sobreexpresaran FKBP51. p65 presenta un máximo porcentaje de células con localización nucleary comienza a disminuir luego de los 45 minutos de tratamiento con TNF- α . Las células que sobreexpresan FKBP51 localización nuclear de p65 para todos los tiempos evaluados entre los 30 y 90 minutos, respecto de células transfectadas con vector. La sobreexpresión de FKBP51 disminuye la translocación nuclear de p65.

En la Figura 2.9.c se grafica el porcentaje de células con localización citoplasmática de p65 (puntaje 0) en función del tiempo de incubación con TNF- α . Los resultados muestran que en la mayor parte de las células, p65 deja de ser citoplasmático alrededor de los 30 minutos post-tratamiento con TNF- α , y que permanece de esta manera durante todo el tiempo ensayado (hasta los 90 minutos). La sobreexpresión de FKBP51 incrementa el porcentaje de células con marca citoplasmática (puntaje 0) de p65 respecto a la condición vector, preponderantemente entre los 30 y 90 minutos de tratamiento con TNF- α . FKBP51 favorece la permanencia de p65 en el citoplasma. Estos resultados son comparables a los obtenidos en células Hek293T transfectadas con p65-HA y FKBP51 y estimuladas con PMA que se mencionan en la sección Introducción.



Figura 2.9 Efecto de FKBP51 sobre la traslocación nuclear de p65. La localización subcelular de p65 fue evaluada luego del tratamiento con TNF- α en función del tiempo para células Hek293T

transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector) por inmunofluorescencia indirecta (sección Materiales y Métodos). Las imágenes fueron obtenidas con microscopio Wide Field Olympus FV1000 y procesadas con el software Image J. Los núcleos fueron identificados con tinción dapi (no mostrado).

a. Sistema de puntaje asociado al grado de localización nuclear de p65 (0 a 3). Los puntajes corresponden a: 0, completamente citoplasmático; 1 y 2, intermedio; 3 enteramente nuclear.

b. Imágenes representativas de inmunofluorescencias indirecta realizadas con anticuerpos anti p65 (verde) y anti FKBP51 (rojo) para células transfectadas el plásmido codificante par FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector) y tratadas con TNF- α 10 ng/ml. Se muestran tiempos representativos de tratamiento con TNF- α correspondientes a 0, 30 y 60 minutos de exposición.

c. Cuantificación de inmunofluorescencia indirecta según el sistema de puntaje esquematizado en la Figura 2.9.a. Se representan los resultados correspondientes a la localización nuclear de p65 (puntaje 3) como el porcentaje promedio de células \pm ES en función del tiempo de tratamiento con TNF- α (0 a 90 minutos).

d. Cuantificación de inmunofluorescencias indirectas según la Figura 2.9.c. Se representan los resultados correspondientes a la localización citoplasmática de p65 (puntaje 0) como el porcentaje promedio de células \pm ES en función del tiempo de tratamiento con TNF- α (0 a 90 minutos). Referencias. Sobreexpresión de **O** Vector vacío,

FKBP51. Las flechas blancas indican las células transfectadas con FKBP51 y su correspondiente marca de p65 (verde). Significativo respecto a vector (* p \leq 0,05, ψ p \leq 0,01).

Expresión de genes blanco de NF-κB

Los ensayos de gen reportero de las Figuras 2.1 a 5 muestran que FKBP51 inhibe la activación transcripcional de NF- κ B de forma independiente a su actividad PPIasa. En la Figura 2.10 se estudia si la regulación de FKBP51 sobre NF- κ B observada en los ensayos de gen reportero se correlaciona con la expresión de genes endógenos. Con dicho objetivo, se transfectaron células Hek293T con el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector), y se trataron durante 5 horas con PMA (100 ng/ml) para evaluar la expresión de ARNm de MMP-9, la cual es regulada por NF- κ B. Mediante ensayos de qPCR se determinaron las veces de inducción la expresión de ARNm MMP9 relativo a los niveles de ARNm de actina calculados mediante el método de ddCT (sección Materiales y Métodos) respecto de las células transfectadas con el vector vacío y tratadas con PMA. La Figura 2.10 muestra que las células que sobreexpresan FKBP51 y fueron incubadas con PMA disminuyeron la expresión de ARNm de MMP-9 respecto del grupo transfectado con el vector y tratado con PMA. Los resultados obtenidos indican que FKBP51 regula negativamente la expresión MMP-9 luego de la estimulación con PMA.

Expresión de ARNm de MMP-9



Figura 2.10. Expresión de genes blanco de NF-κB por qPCR.

La expresión de ARNm de MMP-9 fue evaluada por qPCR y normalizada con el gen actina. Los resultados muestran el promedio de expresión de ARNm normalizada \pm ES para células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o el vector vacío (vector). La cuantificación de ARNm de MMP-9 respecto de actina fue realizada por el método de ddCT y calculada como 2-((CT gen blanco- CT actina)PMA - (CT gen blanco - CT actina) FKBP51) según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Referencias. Significativo respecto a las células transfectadas con el vector vacío y tratadas con PMA (* p< 0,05)

Evaluación de la interacción de p65 con FKBP51 en células Jurkat

NF-kB tiene un rol crucial en distintas etapas de la iniciación y progresión del cáncer ya que regula la expresión de genes relacionados con la proliferación, apoptosis, y angiogénesis (78, 109). La línea celular Jurkat utilizada en el Capítulo 1 es una línea celular derivada de sangre periférica de un paciente con leucemia linfoblástica aguda que presenta características fenotípicas consistentes con linfocitos T CD3+ (123). En la sección Introducción se ha mencionado que p65 es capaz de interactuar con FKBP51 en células Hek293T que sobreexpresan p65 y FKBP51. Es por ello que también estudiamos si la interacción de p65 con FKBP51 también ocurre en esta línea tumoral.

En la Figura 2.11 se muestra la co-inmunoprecipitación realizada a partir de extractos de células Jurkat tratadas con PMA (100ng/ml) o con vehículo (control) durante 30 minutos y luego procesadas según el protocolo de inmunoprecipitación detallado en la sección Materiales y Métodos. Los lisados celulares se incubaron con anticuerpo inmunoprecipitante anti p65 y proteína A-agarosa (II), o bien con anticuerpo IgG no

específico y proteína A-agarosa (NI). Se detectó la presencia de p65 y de FKBP51 en los inmunoprecipitados y en las fracciones totales con anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos demuestran que FKBP51 co-inmunoprecipita con p65, preferentemente en ausencia de tratamiento con PMA.



Figura 2.11. Evaluación de la interacción de p65 con FKBP51. Co-inmunoprecipitación de p65 y FKBP51 en células jurkat luego del tratamiento con PMA (100ng/ml) o vehículo (control) durante 30 minutos. Se evaluó la presencia de p65 y FKBP51 en la fracción total y en los inmunoprecipitados incubados con anticuerpo anti-p65 (I) o con anticuerpo IgG no específico (NI) para todos los tratamientos realizados.

Referencias. Anti-p65 (M): anticuerpo anti p65 isotipo ratón. Anti-p65 (R): anticuerpo anti p65 de isotipo de conejo. I: Inmunoprecipitación con anticuerpo específico anti p65. NI: Inmunoprecipitación con anticuerpo no específico.

Los resultados presentados en este capítulo permiten afirmar que, contrariamente a lo observado en el capítulo anterior con FKBP52, FKBP51 es un regulador negativo de la actividad transcripcional de NF-κB, tanto en ensayos de gen reportero como para el gen de MMP-9. A diferencia del efecto estimulante observado para FKBP52, la actividad PPlasa de FKBP51 no participa de dicha regulación negativa, por lo que esta FKBP no sería el blanco de acción de FK506 en la regulación de los efectos biológicos de NF-κB. Los experimentos realizados indican que FKBP51 no tiene efecto sobre la estabilidad de p65 a diferencia de su homóloga FKBP52. Tampoco se ha encontrado efecto de la sobreexpresión de FKBP51 en células Hek293T para la fosforilación y degradación de lκB, mientras que sí se ha observado una inhibición en la translocación nuclear de p65células transfectadas con FKBP51 y tratadas con TNF-α. Además se ha demostrado que la interacción p65•FKBP51 no es exclusiva del modelo celular Hek293T, ya que también ha sido detectada en una línea celular tumoral de leucemia linfoblástica aguda.

Capítulo 3:

Estudio del rol de FKBP51 y FKBP52 en proliferación y muerte celular.

El factor de transcripción NF-κB regula la expresión de numerosos genes involucrados en diferentes procesos celulares que contribuyen al desarrollo y la progresión del cáncer como: la proliferación, invasión y metástasis, supervivencia, angiogénesis e inflamación. Los resultados presentados en los Capítulos 1 y 2 demuestran que FKBP51 es un regulador negativo de NF-κB, mientras que FKBP52 potencia la actividad de este factor de transcripción de manera dependiente de su actividad enzimática de PPIasa. En vista de estos hallazgos, el presente capítulo aborda el estudio del rol de FKBP51 y FKBP52 en la proliferación y muerte celular. Para estudiar la acción de las IMMs sobre la proliferación y muerte celular, en esta oportunidad se trabajó con células Hek293, y no con Hek293T como en los capítulos anteriores debido a que la línea celular que expresa al antígeno T es resistente al antibiótico neomicina y no permite utilizar el antibiótico G418 como agente de selección para crear células estables a partir de vectores de expresión pCI-neo o pCI-neo FKBP51.

Estudio del efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre la proliferación celular.

A pesar de la acción estimulante sobre la activación de NF-κB observada por sobreexpresión de FKBP52 (Capítulo 1), y del conocido rol de este factor de transcripción en proliferación celular y supervivencia, la transfección del plásmido codificante para FKBP52 en células Hek293 no desencadenó un incremento en el número de células viables respecto del grupo transfectado con el vector vacío (vector). En la Figura 3.1.a se muestran los resultados de ensayos de recuento de células viables con el colorante de exclusión vital *Trypan blue* luego de 96 horas post-siembra para células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52) o el vector vacío (vector). No hay diferencias significativas en el porcentaje de células viables entre los grupos que sobreexpresan FKBP52 y las células transfectadas con el vector vacío. Resultados

similares fueron obtenidos mediante el ensayo de viabilidad celular con MTT luego de 96 horas post-transfección (Figura 3.1.b).

Por el contrario, la sobreexpresión de FKBP51 desencadenó un incremento significativo en el número de células viables luego de 96 horas post-transfección respecto al grupo transfectado con el vector vacío (Figura 3.2.a). De forma análoga, mediante el ensayo de MTT, las células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 mostraron un aumento en la viabilidad celular luego de transcurridas 96 horas post-transfección respecto del grupo transfectado con el vector vacío (Figura 3.2.b). La sobreexpresión de la doble mutante puntual de FKBP51 carente de actividad PPIasa resultó en un incremento en la viabilidad celular comparable al obtenido con FKBP51 *wild type*. En consecuencia, los hallazgos de las Figuras 3.1 y 3.2 sugieren que FKBP51 tendría un efecto estimulante sobre la proliferación celular, el que parece ser dependiente de su actividad enzimática. Por otra parte, la sobreexpresión de FKBP52 no estaría involucrada en este proceso. Estos resultados se encuentran en concordancia con aquéllos previamente reportados por el laboratorio en los que se observó que FKBP51 se encuentra sobreexpresada naturalmente en células y tejidos tumorales y que, además, presenta propiedades antiapoptóticas [sección Introducción, (32, 65)].



Figura 3.1. Efecto de la sobreexpresión transitoria de FKBP52 sobre la proliferación celular.

a. Células Hek293 WT fueron transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52) o el vector vacío (vector) y evaluadas por medio del ensayo de recuento de células viables con el colorante de exclusión vital, *Trypan blue*, luego de 96 horas post-siembra. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje promedio de viables ± ES, asignando un valor igual a 100% al grupo transfectado con el vector vacío para 3 experimentos independientes.

b. Ensayo de viabilidad celular realizado con MTT para células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52) o el vector vacío (vector). Los resultados fueron expresados como porcentaje promedio de viabilidad ± ES asignando un valor igual a 100% al grupo transfectado con el vector vacío para 2 experimentos independientes.

c. *Western blot* representativo de la sobreexpresión de FKBP52 revelado con anticuerpo anti-FKBP52 y anti-GADPH para células transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP52 (FKBP52) o con el vector vacío (vector).



Figura 3.2: Efecto de la sobreexpresión transitoria de FKBP51 sobre la proliferación celular.

a. Células Hek293 WT fueron transfectadas con el plásmido de expresión para FKBP51 (FKBP51) o con el vector vacío (vector) y evaluadas por medio del ensayo de recuento de células viables con el colorante de exclusión vital, *Trypan blue*, luego de 96 horas post-siembra. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje promedio de viables ± ES, asignando un valor igual a 100% al grupo transfectado con el vector vacío para dos experimentos independientes.

b. Ensayo de viabilidad celular realizado con MTT para células transfectadas el plásmido codificante para FKBP51 (FKBP51), FKBP51 FD67/68 DV (FKBP51 FD67/68 DV), o el vector vacío (vector). Los resultados fueron expresados como porcentaje promedio de viabilidad ± ES asignando un valor igual a 100% al grupo transfectado con el vector vacío para dos experimentos independientes.

Referencias: Significativo respecto al grupo transfectado con el vector vacío (*p≤0,05).

Como consecuencia de los resultados antes mencionados para células Hek293T transfectadas con FKBP51, se procedió a generar una línea celular de Hek293 que

Capítulo 3

expresase en forma estable a la proteína humana FKBP51 mediante la selección con el antibiótico G418. Se obtuvieron 3 clones independientes de la de la línea Hek293 (no T) sobreexpresando a FKBP51 (clon 1, 2 y 3) según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Como grupo control de la línea Hek293 FKBP51 se utilizó la línea parental (Hek293 WT) y una línea establemente transfectada con el vector vacío (Hek293 pCI-neo) tratada con el agente de selección G418. En la Figura 3.3.a y 3.b se muestran los ensayos de *Western blot* representativos para evaluar la expresión de las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 en las líneas celulares Hek293 WT, Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo.



Figura 3.3: *Western blot* representativos de líneas celulares estables que sobreexpresan a la proteína FKBP51.

a. Western blot de línea celular wild type (Hek293 WT) y tres clones independientes de línea estable que sobreexpresa FKBP51 (Hek293 FKBP51 clon 1 a 3).

b. Western blot de línea celular estable transfectada con vector vacío y resistente a neomicina (Hek293 pCI-neo) y un clon de la línea estable que sobreexpresa FKBP51 (Hek293 FKBP51 clon 3).

En la Figura 3.4 se muestra el resultado de la proliferación de las líneas celulares estables generadas en el laboratorio respecto de la línea parental Hek293 WT por recuento de viables con el colorante *Trypan blue*. Se obtuvo un incremento significativo del porcentaje de células viables para todos los clones de Hek293 FKBP51 respecto a la línea parental y a la línea celular Hek293 pCI-neo. No se encontraron diferencias significativas entre la línea celular Hek293 WT y Hek293 pCI-neo, indicando que no se vislumbra un efecto que sea producto del tratamiento con G418 sobre la proliferación celular. Los resultados obtenidos en la Figura 3.4 refuerzan los hallazgos realizados mediante la transfección transitoria con el plásmido codificante para FKBP51 (Figura 3.2).

Recuento de células viables



Figura 3.4: Estudio de la proliferación celular para células Hek293 FKBP51 por recuento de células viables. El recuento fue realizado con *Trypan blue* luego de 96hs de cultivo para líneas celulares Hek293 *wild type* (Hek293 WT), Hek293 resistente a neomicina (Hek293 pCI-neo) y tres clones independientes de Hek293 que sobreexpresan de forma estable FKBP51 (Hek293 FKBP51). Los valores se expresan como porcentaje promedio de células viables \pm ES con 100% de células asignado a Hek293 WT. Los resultados se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes para cada línea celular por duplicado. Referencias: * significativo respecto a Hek293 WT (p≤0,05).

El silenciamiento de FKBP51 en la línea celular Hek293 FKBP51 por la transfección con una mezcla de vectores shRNA (shRNA) desencadenó una disminución en el recuento de células viables luego de 96 horas post-siembra respecto del grupo transfectado con el vector vacío (vector). En la Figura 3.5.a se representan los resultados del promedio de células viables obtenidas por recuento celular luego de 96 horas post-siembra ± ES, y en la Figura 3.5.b se muestra un ensayo de *Western blot* representativo del silenciamiento de FKBP51. El silenciamiento de FKBP51 genera una disminución en el recuento de células viables alcanzando un número de células viables comparable a los obtenidos con la línea celular parental (Figura 3.4). En su conjunto, los resultados de las Figuras 3.2 a 3.4 sugieren fuertemente que FKBP51 podría tener un rol positivo sobre la proliferación en células Hek293 que puede ser revertido por una disminución en su expresión.

Silenciamiento de FKBP51



Figura 3.5. Efecto del silenciamiento de FKBP51 sobre la proliferación en células Hek293 FKBP51.

a. Ensayo de proliferación celular por recuento de células viables con *Trypan blue* luego de 96 hs post-siembra para células Hek293 FKBP51 transfectadas con vector vacío (vector) o con la mezcla de shRNA para silenciar FKBP51 humana (shRNA). Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de células viables ± ES con 100% de viables asignado a las células transfectadas con vector vacío. Los resultados fueron obtenidos a partir de 3 experimentos independientes de recuento de células por duplicado.

 b. Evaluación de la expresión de FKBP51 por Western blot para células transfectadas con vector vacío (vector, réplica 1 y 2) o para la mezcla de shRNAs contra FKBP51 (shRNA, réplica 1 y 2) por duplicado para ambas condiciones. Referencias: Significativo respecto a vector (** p≤0,01).

Los ensayos de recuento de células viables y la determinación de la viabilidad celular con MTT nos indican un incremento en la proliferación celular producto de la sobreexpresión de FKBP51. Para corroborar este descubrimiento, se decidió evaluar la proliferación celular con la sonda fluorescente, carboxi-fluoresceína succinimidil éster (CFSE). CFSE tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática y, al ingresar a la célula, formar uniones covalentes estables con los grupos amino de moléculas intracelulares. Luego de cada división celular se espera que la sonda se segregue de forma equitativa a cada célula hija, permitiendo evaluar la proliferación celular por disminución de la fluorescencia emitida.

Fue así como la proliferación celular fue evaluada por uso de CFSE, tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo. En la Figura 3.6.a y 3.6.b se muestra la cuantificación de la fluorescencia relativa de CFSE por célula, cuantificada con microscopio de fluorescencia y el *software* Image J. Los resultados muestran que existe una mayor disminución de la fluorescencia para células Hek293 FKBP51 respecto de la línea celular Hek293 WT luego de 96 horas post-marcación con la sonda.

Resultados similares fueron obtenidos por la cuantificación por citometría de flujo. En la Figura 3.7 se presentan histogramas representativos del número de células en función de la intensidad de fluorescencia registrada a 488 nm luego de 24, 72 y 96 horas postmarcación con la sonda, así como el número de generaciones estimadas por el *software* ModFIT LT para cada condición. El índice de proliferación determinado con ModFIT LT de la Tabla 3.1 y el número de generaciones indican que la tasa de proliferación de la línea celular Hek293 FKBP51 es superior a la de la línea celular Hek293 pCI-neo. El análisis de los resultados obtenidos con microscopio de fluorescencia y por citometría de flujo, sugieren que la sobreexpresión de FKBP51 sería causal de un aumento en la proliferación de celular.



Figura 3.6: Determinación de la fluorescencia de CFSE por microscopia de florescencia.

a. Se muestra la fluorescencia individual por célula relativa según se indica en la sección Materiales y Métodos. Las barras indican la media y la desviación estándar de las mediciones para células Hek293 WT y Hek293 FKBP51 en condiciones de fluorescencia inicial (Hek293 WT y Hek293 FKBP51) y 96 horas de incubación (Hek293 WT 96 hs y Hek293 FKBP51 96 hs). Los resultados de un experimento independiente para alrededor de 100 células individuales por condición son expresados en U.A. relativos a la condición de fluorescencia inicial a la cual le fue asignado un valor promedio de 100 U.A. de fluorescencia.

b. Se representa la fluorescencia individual relativa promedio ± DE en U.A para la fluorescencia inicial (Hek293 WT y Hek293 FKBP51) y luego de 96 horas de incubación (Hek293 WT 96 hs y Hek293 FKBP51 96 hs). Los resultados se expresan considerando al promedio de fluorescencia inicial para cada línea celular igual a 100 U.A.



Figura 3.7. Determinación de fluorescencia de CFSE por citometría de flujo.

Se representan los histogramas obtenidos por citometría de flujo para la fluorescencia de CFSE individual por célula para células incubadas durante los tiempos indicados.

a. Histogramas correspondientes a células Hek293 pCI-neo (24, 72 y 96 horas post-marcación).

b. Histogramas de células Hek293 FKBP51 (24, 72 y 96 horas post-marcación).

Índice de proliferación	24 horas 72 horas		96 horas
Hek293 pCI-neo	1,07	5,59	5,72
Hek293 FKBP51	1,02	6.12	11.54

Tabla 3.1. Índice de proliferación. Se evidencia el índice de proliferación relativo para células Hek293 pCI-neo y Hek293 FKBP51 luego de 24, 72 y 96 horas post-marcación. Los resultados corresponden a los índices de proliferación determinados con el software ModFIT LT a partir del análisis de resultados de células marcadas con CFSE y evaluadas por citometría de flujo de la Figura 3.7.

Los experimentos de sobreexpresión ya sea transitoria o estable de la inmunofilina FKBP51 permiten concluir que FKBP51 genera un aumento en la proliferación de células Hek293, efecto que puede ser revertido de manera acorde por el silenciamiento de la IMM. La proliferación celular fue evaluada mediante diferentes técnicas, el ensayo de MTT, el recuento de células viables con *Trypan Blue*, y la segregación de la sonda fluorescente CFSE, arribándose a conclusiones similares en todos los casos.

Estudio del efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre la muerte celular.

Como ya se ha mencionado en varias oportunidades, la supervivencia celular es uno de los procesos en los que el factor de transcripción NF- κ B ejerce su acción regulatoria (sección Introducción). Trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo, ya habían demostrado que la sobreexpresión transitoria de FKBP51 en células Hek293T y en 3T3-L1 favorecía la supervivencia frente al tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y por inhibición de la apoptosis [sección Introducción, (32, 65)]. En esta oportunidad se evaluó si la línea celular estable de Hek293 generada en el laboratorio que sobreexpresa a FKBP51 también presentaba un aumento de la supervivencia celular respecto a células *wild type*.

En la Figura 3.8.a se muestran los resultados correspondientes a los ensayos de la sal bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para la línea celular Hek293 FKBP51 y su línea parental tratadas con H₂O₂ luego de 24 horas post-incubación. El ensayo de MTT permite evaluar por un método colorimétrico el metabolismo celular y estimar la viabilidad celular frente a estímulos citotóxicos. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje promedio de viabilidad en función de la concentración de H_2O_2 (0 a 500 μ M) y se ajustan a una función sigmoidea. Se observa que la viabilidad celular disminuye en forma dependiente de la concentración de H₂O₂ para ambas líneas celulares, y que dicha reducción es significativamente menor para células Hek293 FKBP51 respecto de su línea parental. Con el software GraphPad Prism 6 se determinó la concentración citotóxica media (CC50) de H₂O₂ para células Hek293 WT (CC50 H₂O₂: 40,86 µM ± 1,18) y Hek293 FKBP51 (CC50 H₂O₂: 124,88 µM ± 1,12) partir del ajuste sigmoideo de los datos experimentales. El análisis cuantitativo fue acompañado de imágenes representativas adquiridas con un microscopio óptico (Figura 3.8.b) de tres concentraciones de H₂O₂ (0, 100 y 500 µM) para Hek293 WT y Hek293 FKBP51. Se observan diferencias morfológicas que sugieren una mayor susceptibilidad de la línea parental respecto de la línea celular estable frente al tratamiento con H₂O₂, especialmente entre ambos tipos celulares tratados con $H_2O_2 100 \mu M$.

La estaurosporina es un producto natural que induce la muerte celular por ser un potente inhibidor de amplio número de proteína-quinasas [PKC, PKA, CamK y PI3K, entre otras, (130)]. La estaurosporina y sus derivados han sido evaluados en el tratamiento contra el cáncer, habiéndose obtenido resultados prometedores en especial con uno de sus derivados, la midoestaurina (131). En la Figura 3.8.c se evaluó el efecto del tratamiento con estaurosporina frente a la viabilidad celular de la línea Hek293 FKBP51 respecto a su línea parental. Análogamente a los ensayos llevados a cabo mediante el tratamiento con H₂O₂, se evaluó la viabilidad celular con el ensayo de MTT en ambas líneas celulares incubadas con diferentes concentraciones de estaurosporina (0 a 500 nM) durante 24 horas. Los resultados muestran una reducción de la viabilidad celular dependiente de la concentración de estaurosporina y una menor susceptibilidad con una CC50 alrededor de diez veces mayor de la línea celular que sobreexpresa FKBP51 (CC50 estaurosporina: 149,26 nM ± 1,38) respecto de la línea parental (CC50 estaurosporina: 868,16 nM ± 1,71). Nuevamente, la línea que sobreexpresa a FKBP51 muestra una mayor sobrevida ante un estímulo deletéreo sugiriendo que FKBP51 es un factor que favorece la sobrevida celular.

Los ensayos realizados en presencia de H₂O₂ con la línea celular Hek293 FKBP51 generada en el laboratorio mostraron propiedades semejantes a las ya reportadas en estudios previos en relación con la supervivencia celular (65, 132). La sobreexpresión de FKBP51 también generó un incremento en la viabilidad celular equivalente al del tratamiento con peróxido, pero en células tratadas con estaurosporina, un estímulo no relacionado al primero. Los hallazgos sugieren que FKBP51 podría tener un rol positivo sobre la supervivencia celular frente al tratamiento con diferentes agentes citotóxicos en esta línea celular.



Figura 3.8 Efecto de FKBP51 sobre la muerte de celular.

a y c. Ensayo de MTT para línea celular parental (Hek293 WT) y línea celular que sobreexpresa FKBP51 humana (Hek293 FKBP51). Las células fueron tratadas con distintas concentraciones de **a.** H_2O_2 (0 a 500 µM) o **c.** Estaurosporina (0 a 500 nM). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de viabilidad ± ES en función de la concentración de H_2O_2 o estaurosporina (EST), expresadas en escala logarítmica. Los valores de viabilidad fueron relativizados considerando 100% de viabilidad a la condición sin tratamiento de cada línea celular. Hek293 WT (CC50 H_2O_2 : 40,86 µM ± 1,18) y Hek293 FKBP51 (CC50 H_2O_2 : 124,88 µM ± 1,12). Hek293 WT (CC50 EST: 149,26 nM ± 1,38) y Hek293 FKBP51 (CC50 EST: 868,16 nM ± 1,71).

b. Imágenes representativas de células Hek293 WT y Hek293 FKBP51 tratadas con H_2O_2 (0, 100 o 500 μ M) durante 24 horas.

d. Imágenes representativas de células tratadas con Estaurosporina (0, 100 o 500 nM).

Referencias: ajuste no lineal: ajuste a curva sigmoide de resultados experimentales. EST: Estaurosporina.

Hasta el presente no se había sido reportado que FKBP52 posea un rol directo sobre la muerte o la proliferación celular. Sólo se había postulado que la expresión de FKBP52 se encuentra aumentada en algunos tipos de tumores como los de mama, glioblastomas y próstata [sección Introducción]. Los ensayos de la Figura 3.1.a muestran que la sobreexpresión de FKBP52 en células Hek293 no desencadena efectos significativos sobre la proliferación celular. En la Figura 3.9 se evaluó el efecto de la sobreexpresión de FKBP52 sobre la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en células tratadas con H₂O₂. Contrariamente a lo observado por la sobreexpresión de FKBP51, la sobreexpresión de FKBP52 desfavoreció la viabilidad celular en células expuestas a H₂O₂ (Figura 3.9.a) respecto a células transfectadas con el vector vacío, y si bien no mostró cambios estadísticamente significativos frente al tratamiento con estaurosporina bajo esas condiciones experimentales (Figura 3.9.b), se vislumbra una ligera tendencia a decrecer la viabilidad. Esta propiedad de FKBP52 podrían justificarse en parte debido a una eventual acción antagónica con FKBP51, la que ya ha sido evidenciada en otros trabajos del laboratorio en incluso en esta misma tesis (p.ej. actividad transcripcional de NF- κ B o eficiencia de transporte al núcleo)



b. Efecto de FKBP52 sobre la muerte celular

Figura 3.9. Efecto de la sobreexpresión de FKBP52 sobre la muerte celular.

a. Ensayo de MTT para células tratadas con H_2O_2 100 μ M durante 24 horas y transfectadas con FKBP52 o vector vacío. Los valores fueron expresados como porcentaje promedio de viabilidad \pm ES respecto al 100% asignado a la condición transfectada con vector vacío con H_2O_2 .

b. Ensayo de MTT para células tratadas con estaurosporina 100 nM durante 24 horas y transfectadas con FKBP52. Valores expresados como porcentaje de viabilidad ± ES respecto al 100% asignado a la condición transfectada con vector vacío con Estaurosporina.

Referencias: significativo respecto vector con tratamiento (* $p \le 0.05$).

a. Efecto de FKBP52 sobre la muerte celular

En el Capítulo 1 se demostró que la sobreexpresión de FKBP52 en células Hek293T no es suficiente *per se* para inducir la actividad transcripcional de NF-κB, sino que además se necesita de un estímulo externo del factor de transcripción para potenciar su acción. En tal sentido, resulta apropiado resaltar que la familia de factores de transcripción E2F tiene un rol central en la regulación del ciclo celular, la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular. Adicionalmente, se ha reportado que E2F interactúa con la subunidad p65 y que existe una regulación coordinada de ambos factores en la progresión del ciclo celular (103, 133). La interacción de p65 con E2F1-3 tiene un efecto inhibitorio sobre la acción de E2F; mientras que impide la formación del heterodímero activo p65/p50 (102, 103, 133). E2F tiene un rol dual dependiendo del contexto y los estímulos externos, su acción puede inducir tanto la muerte celular, como favorecer la entrada a la fase S del ciclo celular (98, 99).

Hasta el presente no se ha reportado que exista alguna relación entre las proteínas FKBPs y la familia de factores de transcripción E2F, pero en base a la particularidad del efecto arriba comentado que depende de la inmunofilina y del estímulo, hipotetizamos que el mecanismo podía no ser lineal y que otro/s factor/es podría/n estar involucrado/s. Una posibilidad interesante radica en el hecho de que los miembros de la familia de E2F también se vieran afectados por la IMM. Con el fin de analizar esta nueva hipótesis, se realizaron ensayos de gen reportero para E2F1, E2F2, E2F3 y E2F4 en células Hek293 (según sección Materiales y Métodos) transfectadas con los vectores de expresión para FKBP51 (FKBP51), FKBP52 (FKBP52) o el vector vacío. En la Figura 3.10 se muestran los ensayos de gen reportero para E2F luego de transfectar a las células con las isoformas denominadas tradicionalmente activadoras, E2F1, E2F2 y E2F3. En todos los casos, la sobreexpresión de FKBP51 desencadenó un incremento en la actividad transcripcional de los factores E2F respecto a las células transfectadas con el vector vacío. La sobreexpresión de FKBP52 resultó en un incremento aún mayor y significativo de la actividad transcripcional de E2F1-3.



e. Actividad transcripcional de E2F3



Figura 3.10: Efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre la actividad transcripcional de E2F1, E2F2

y E2F3. Ensayos de gen reportero para distintos E2F con cantidades crecientes de plásmido de expresión para FKBP51 (0, 250, 375 o 500 ng) o para FKBP52 (0, 250, 375 o 500 ng). Valores representados como porcentaje promedio de actividad transcripcional de E2F ± ES con 100% activación para E2F sin FKBPs. a. E2F1-HA. c. E2F2-HA. e. E2F3-HA. b, d, f. *Western blot* representativos de la sobreexpresión de E2F-HA correspondientes, FKBP51 y FKBP52. (b. E2F1-HA, d. E2F2-HA). Referencias: Significativo respecto al grupo que sobreexpresa el factor E2F correspondiente y transfectado con el vector vacío (*p≤ 0,05).

E2F4 pertenece al grupo de factores de transcripción E2F considerados represores de la transcripción. El modelo general actualmente aceptado propone que E2F4 ocupa los sitios promotores de respuesta a E2F activadores, desplazando a estos factores de transcripción y reprimiendo la expresión de los genes blanco por reclutamiento de co-factores y modificadores de la cromatina. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que los E2F considerados tradicionalmente como represores, también inducen la expresión de numerosos genes (sección Introducción). Se han realizado hallazgos que proponen un rol positivo de E2F4 en la diferenciación neuronal inducida por NGF (*Neuronal Growth Factor*) (134) y en la diferenciación de progenitores hematopoyéticos al linaje linfoide (135).

Los ensayos de gen reportero de la Figura 3.11.a muestran que la sobreexpresión de FKBP52 induce significativamente la activación transcripcional de E2F4 respecto de las células transfectadas con el vector vacío, mientras que la sobreexpresión de FKBP51 tiene escaso o nulo efecto. En la Figura 3.11.b se evaluó la contribución de la actividad de PPIasa de FKBP52 sobre la activación transcripcional de E2F4. La sobreexpresión de la proteína mutante de FKBP52 sin actividad enzimática (FKBP52 F130Y) resultó en una disminución significativa de la actividad transcripcional de E2F4 respecto de las células transfectadas con el vector de expresión para FKBP52 *wild type*. De forma análoga a lo reportado en el Capítulo 1 sobre la potenciación de la actividad transcripcional de NF-kB por FKBP52, en este caso, la actividad PPIasa de FKBP52 parece ser relevante también en la activación de E2F4



Figura 3.11. Efecto de FKBP51 y FKBP52 sobre la actividad transcripcional de E2F4.

a. Ensayo de gen reportero para E2F4 con cantidades crecientes del vector de expresión para FKBP51 (0, 250, 375 o 500 ng) o para FKBP52 (0, 250, 375 o 500 ng). Valores representados como porcentaje promedio de actividad transcripcional de E2F ± ES con 100% activación para E2F4 sin FKBPs. **b.** *Western blot* representativos de la sobreexpresión de E2F4-HA, FKBP51 y FKBP52, detectados con anticuerpo anti HA, anti FKBP51 o anti FKBP52, respectivamente. **c.** Ensayo de gen reportero para E2F4-HA con cantidades crecientes de FKBP52 (0, 375 y 500 ng) o de FKBP52 F130Y, una mutante de FKBP52 sin actividad enzimática, (0, 375, 500 ng). **d.** *Western blot* representativo de la sobreexpresión de FKBP52, FKBP52 F130Y y E2F4-HA detectado con anticuerpo anti HA.

Referencias: Significativo respecto a control con E2F4 en ausencia de sobreexpresión de FKBPs (*p≤ 0,05).

Si bien los ensayos de gen reportero para los factores de transcripción E2F sugieren que tanto FKBP51 como FKBP52 serían potenciales reguladores positivos de su actividad transcripcional, no es posible determinar mediante estos experimentos la identidad de los genes blanco de E2F que serían inducidos por FKBP51 y FKBP52. Tampoco sería entonces posible poder definir el destino celular luego de la activación de los factores E2F (apoptosis, proliferación celular, diferenciación). Es posible que tanto el efecto pro-proliferativo y antiapoptótico de FKBP51, así como la mayor susceptibilidad a la muerte celular en células que sobreexpresan FKBP52, sean responsabilidad de la acción de estas FKBPs sobre factores de la familia E2F, o bien por una regulación coordinada entre E2F y NF- κ B.

En resumen, se confirma la acción antiapoptótica de FKBP51, la cual ya había sido reportada por nuestro laboratorio (65). Se describe además un rol novedoso de FKBP51 en la proliferación celular. Teniendo en consideración la acción de FKBP51 sobre los procesos celulares antes mencionados, y que niveles incrementados de esta IMM se encuentran en células tumorales y líneas celulares cancerosas (32, 61), resulta de gran interés evaluar el efecto de la sobreexpresión de FKBP51 sobre la expresión génica. En tal sentido, debe remarcarse que a diferencia de lo que ocurre en la gran mayoría de los tumores humanos estudiados, la expresión de FKBP51 se encuentra disminuida en el caso particular del cáncer de páncreas. En cáncer de páncreas, FKBP51 tiene acción pro-apoptótica y este efecto es producto de la regulación existente entre FKBP51 y el modulador transcripcional Akt (33, 62). Esta observación es contraria a lo que ocurre en la mayoría de los tumores y a lo encontrado en este capítulo. El único mecanismo propuesto para FKBP51 en células cancerosas no puede explicar la acción pro-proliferativa y antiapoptótica de FKBP51. Con el objetivo, de profundizar el estudio de la sobreexpresión de FKBP51, se realizó un ensayo comparativo de la expresión de genes entre células Hek293 pCI-neo y Hek293 FKBP51 con un microarreglo.

Estudio de la expresión diferencial de genes entre Hek293 FKBP51 y Hek293 pCIneo con un microarreglo de expresión.

Células Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo fueron cultivadas en condiciones estándar para realizar el ensayo de microarreglo. La extracción de ARN fue efectuada con Trizol (sección Materiales y Métodos). Se utilizaron 4 muestras de ARN de cada línea obtenidas según se especifica en la sección Materiales y Métodos. Las muestras fueron seleccionadas y dispuestas para evitar efectos provenientes del número de pasaje celular, las condiciones de cultivo y la ubicación en el *slide*. La expresión génica fue estudiada con el microarreglo de expresión de un color SurePrint G3 Human GE v2 8x60K (Agilent) de 8 muestras con cobertura para 60.000 sondas. El ensayo de microarreglo propiamente dicho fue realizado por el servicio de microarreglos proporcionado por el Instituto Pasteur de Montevideo, a cargo del Dr. Carlos Robello. Los datos correspondientes a la intensidad de fluorescencia registrada para cada muestra y sonda, fueron enviados a nuestro laboratorio. La anotación, el análisis estadístico y biológico de los datos fue llevado a cabo en nuestro laboratorio como se detalla en la sección Materiales y Métodos.

El procesamiento de los datos fue realizado con la herramienta BRB array tools (NIH). Se aplicó un filtro de detección de fluorescencia con un umbral de intensidad mínimo igual a 5 U.A, y se promedió la intensidad correspondiente a los spots replicados en el *slide*. Cada sonda en el *slide* cuenta con un identificador único. Mediante la anotación, a cada identificador le es asignado un símbolo de gen, nombre de gen o una secuencia de NCBI o EnsEMBL. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron normalizados también por el método de cuantiles, y los transcriptos fueron filtrados según las veces inducción (*Fold change*) de su expresión entre ambas líneas celulares estables (*Fold change* \geq 1,5; o *fold change* \leq 0,5). De los 62977 transcriptos evaluados con el arreglo, incluyendo controles internos, 8185 fueron recuperados luego de la aplicación de los filtros y normalizaciones. En la Figura 3.12 se presenta una representación gráfica de los transcriptos con expresión incrementada (Figura 3.12.a) y disminuida (Figura 3.12.b) en Hek293 FKBP51 respecto a Hek293 pCI-neo.



Figura 3.12. Scatter plot. Expresión promedio de los transcriptos en células Hek293 FKBP51 (ordenadas) y células Hek293 pCI-neo (absisas).

- a. Transcriptos con expresión promedio incrementada (verde) en la línea celular Hek293 FKBP51 respecto de Hek293 pCI-neo considerando como línea de corte *fold change* ≥ 1,5
- b. Transcriptos con expresión promedio disminuida (verde) en células Hek293 FKBP51 respecto a Hek293 pCI-neo con fold change ≤ 0,5.

La comparación entre Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo con una prueba t de Student de varianza aleatoria devolvió 272 transcriptos expresados diferencialmente entre ambas líneas celulares con un nivel de significancia de p \leq 0,001, y 571 genes con un p valor mayor (p \leq 0,005). En la Figura 3.13 se exhibe una representación gráfica del resultado del análisis estadístico.



Figura 3.13. Volcano Plot de los genes expresados en Hek293 FKBP51 vs pCI-neo-

Los genes que resultaron luego del filtrado de datos por intensidad (sección Materiales y Métodos) se encuentran representados individualmente con un círculo. Los círculos azules corresponden a los genes significativos del análisis. El *p-value* corresponde al p valor determinado por comparación de clases (t test de varianza aleatoria), donde la línea punteada indica el valor de corte en escala logarítmica (p≤ 0,001). El *fold change* se expresa como el logaritmo de la intensidad promedio normalizada de Hek293 FKBP51 dividido por el logaritmo de la intensidad promedio de Hek293 pCI-neo para el mismo gen. Los valores de log (*Fold Change*) positivos corresponden a los genes con expresión aumentada en Hek293 FKBP51 respecto a Hek293 pCI-neo, mientras que los valores negativos se asocian a los genes con expresión disminuida.

En la Figura 3.14 se muestra la agrupación de transcriptos expresados diferencialmente ($p \le 0,001$) en *clústers* jerárquicamente por distancia euclidiana entre ambas líneas celulares obtenido con la BRB array tools como se detalla en la sección Materiales y Métodos.



Figura 3.14. *Heatmap* de los transcriptos expresados diferencialmente entre Hek293 pClneo y Hek293 FKBP51.

Cada columna corresponde a una muestra específica (1 a 8) según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Las muestras pudieron ser agrupadas en dos grandes clases, Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo. Las filas corresponden a transcriptos independientes que fueron agrupados en clusters según expresión y similitud de secuencia. A la derecha del gráfico se presenta la referencia de color según el nivel de expresión de los transcriptos.

La lista de 572 transcriptos con expresión diferencial entre ambas líneas celulares ($p \le 0,005$) obtenida con BRB array tools fueron estudiados con el *software* Ingenuity Pathways (IPA, Quiagen). De estos 571 transcriptos, 478 corresponden a genes, y 93 no están asociados a ningún gen conocido. Las secuencias no codificantes contienen 50 LincRNAs (*Long intergenic non coding RNAs*), 37 LncRNAs (*Long Non Coding RNAs*) y 6 snoRNAs (*small nucleolar RNAs*). En su gran mayoría, no se ha reportado función biológica conocida para estas secuencias, pero su composición nucleotídica se

encuentra depositada en NCBI, EnsEMBL o en la base de datos LNCpedia. Como consecuencia de esto, los sucesivos análisis biológicos, no han tenido en cuenta las secuencias no codificantes, sólo los genes con expresión diferencial obtenidos con el microarreglo.

Los genes determinados experimentalmente fueron contrastados estadísticamente con un F-test (p≤0,05) con listas de genes agrupados por funciones biológicas y/o enfermedades en las que participan según la base de datos Knowledge Data Base (Quiagen). En la Tabla 3.1 se muestran las principales categorías de funciones celulares y moleculares que se muestran alteradas en células que sobreexpresan FKBP51 respecto a la línea celular control. Entre las principales categorías se incluyen algunas relacionadas con el crecimiento celular y la proliferación, lo cual muestra coincidencia con las observaciones fenotípicas presentadas en el presente capítulo. Las categorías de funciones moleculares y celulares están acompañadas de un rango de p-valores, correspondientes a las funciones específicas agrupadas dentro de dicha categoría. También se informa el número de moléculas del microarreglo que forman parte de la categoría en cuestión

Función molecular y celular (categorías)	Rango de p-valores		Número de moléculas
Desarrollo celular	- WPL Train	8,91E-03 - 4,35E-07	100
Crecimiento celular y proliferación		8,91E-03 - 4,35E-07	81
Morfología celular		8,91E-03 - 9,09E-07	87
Funciones celulares y mantenimiento		8,91E-03 - 9,09E-07	84
Organización de células	122458790 N	8,91E-03 - 9,95E-07	86

Tabla 3.2. Lista de las principales funciones moleculares y celulares, agrupadas en categorías, a las cuales pertenecen los genes con expresión diferencial entre ambas líneas celulares.

Cada categoría está acompañada del rango de p-valores de las funciones biológicas que agrupa, así como el número de genes con expresión diferencial entre Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo relacionados con la categoría en cuestión.

. En la Tabla 3.3 se exhiben algunas de las funciones moleculares y celulares específicas que forman parte de las categorías anteriores. Las funciones biológicas de la Tabla 3.3 además muestran un z-score para cada una de ellas. El z-score corresponde a una variable calculada por el software IPA que, a partir del nivel de expresión de los genes en el microarreglo, y la información disponible en bases de datos, realiza una predicción acerca del incremento o disminución de la función biológica estudiada. En la

primera parte de la tabla se muestran las funciones que según el z-score calculado (zscore $\ge 2,00$) se pronostica que se verían estimuladas en Hek293 FKBP51 respecto de Hek293 pCI-neo. En la segunda parte, se muestran las funciones biológicas con z-score \le -2,00. En general, el análisis realizado con IPA predice que las funciones biológicas relacionadas con proliferación, crecimiento celular e invasión se encontrarían estimuladas en las células que sobreexpresan FKBP51 respecto de la línea celular control. Estas funciones incluyen, invasión de células, organización del citoesqueleto, cantidad de células, mitogénesis de líneas celulares tumorales, formación de prolongaciones celulares, entre otras. Por otro lado, el análisis con IPA de los resultados obtenidos con el microarreglo de expresión muestra que aquellas funciones biológicas asociadas a muerte celular se verían desfavorecidas. Nuevamente, estos resultados complementan los hallazgos presentados en el presente capítulo en relación con un posible rol de FKBP51 como agente pro-proliferativo y antiapoptótico.

Funciones biológicas anotadas	p-valor	predicción	z-score	número de moléculas
Diferenciación de células madre	1,13 x 10 ⁻³	incrementado	3,537	16
Contacto célula – célula	8,93 x 10 ⁻⁴	incrementado	3,345	33
Dinámica de microtúbulos	4,42 x 10 ⁻⁴	incrementado	3,319	58
Invasión de células	6,64 x 10 ⁻⁴	incrementado	3,171	45
Organización del citoesqueleto	7,38 x 10 ⁻⁴	incrementado	2,837	65
Crecimiento de tejido embrionario	2,41 x 10 ⁻³	incrementado	2,741	16
Cantidad de células	7,48 x 10 ⁻³	incrementado	2,706	72
Formación de prolongaciones celulares	1,12 x 10 ⁻⁴	incrementado	2,485	49
Invasión de líneas celulares tumorales	7,47 x 10 ⁻³	incrementado	2,479	33
Mitogénesis de líneas celulares tumorales	5,38 x 10 ⁻³	incrementado	2,091	5
Diferenciación de neuronas	2,47 x 10 ⁻⁶	incrementado	2,049	30
Muerte de organismo	4,80 x 10⁻³	disminuido	-6,107	96
Morbilidad o mortalidad	1,62 x 10⁻³	disminuido	-5,832	100
Muerte prenatal	2,53 x 10⁻³	disminuido	-3,834	29
Degeneración de órganos	2,50 x 10⁻³	disminuido	-3,057	28
Neurodegeneración de nervios	3,19 x 10 ⁻³	disminuido	-2,219	5
Neurodegeneración de neuronas	1,59 x 10⁻³	disminuido	-2,211	6
sensoriales				

Tabla 3.3. Lista de funciones biológicas anotadas en las que participan los genes con expresión diferencial entre células Hek293 FKBP51 y de Hek293 pCl-neo.

Se muestran las funciones biológicas anotadas, acompañadas del z-score y la predicción realizada a partir del z-score para la estimulación o disminución de la función biológica correspondiente. El número de moléculas corresponde al número de genes expresados

diferencialmente entre ambas líneas celulares que participan de la función biológica en cuestión. Los genes expresados diferencialmente entre Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo que participan de las funciones biológicas de mayor relevancia para este trabajo se presentan en la Figura 3.15 en un diagrama radial (IPA, Quiagen).


Figura 3.15. Genes con expresión diferencial entre ambas líneas celulares agrupados según las funciones biológicas en las que participan.

a. Genes que participan de la invasión celular, b. regulación de la cantidad de células y c. la mitogénesis.

Referencias: los genes son nombrados por el símbolo de gen. Los colores representan el nivel de expresión determinado en el microarreglo para Hek293 FKBP51 respecto de Hek293 pCI-neo (rojo-rosa: expresión aumentada, azul-celeste: expresión disminuida, naranja: z-score \geq 2,00, celeste: z-score \leq -2,00, gris: predicción no disponible, amarillo: contradicción entre la predicción por z-score y la expresión del gen).

Alrededor de 371 genes de los 572 expresados diferencialmente entre Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo, presentan una expresión alterada en diferentes tipos de cáncer (Tabla 3.4). En su conjunto, tanto los genes asociados a cáncer que resultaron del microarreglo, como los que participan de las funciones biológicas relacionadas con proliferación, invasión y muerte, mostradas en la Tabla 3.2, podrían ser algunos de los responsables de los efectos pro-proliferativos y antiapoptóticos de FKBP51.

Enfermedades y desórdenes (categorías)	Rango de p-valores		Número de moléculas
Cáncer		8,19E-03 - 8,17E-08	371
Enfermedades gastrointestinales	34443	7,28E-03 - 8,17E-08	339
Daño y anormalidades en organismos		8,91E-03 - 8,17E-08	375
Desórdenes de tejido conectivo	- 4 ' .	8,91E-03 - 4,26E-06	44
Enfermedades neurológicas	123458790	8,63E-03 - 1,96E-05	99

Tabla 3.4. Enfermedades y desórdenes agrupados en categorías en los cuales la expresión de los genes determinados en el ensayo de microarreglo se encuentra alterada.

Los genes con expresión diferencial entre Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo fueron contrastados con información presente en la base de datos Knowledge Data Base, Quiagen, que recopila información publicada y anotada de ensayos de secuenciación masiva, microarreglos y qPCR. Los resultados del F-test (p≤0,05) se muestran en la tabla, acompañados con el rango de p-valores de la enfermedades y desórdenes que participan de la categoría correspondiente. El número de moléculas corresponde al número de genes del microarreglo realizado que están asociadas a cada categoría.

A continuación, se realizaron diferentes análisis relacionados con las vías de señalización en las que participarían los genes expresados diferencialmente entre ambas líneas celulares. En la Figura 3.16 se muestran las vías de señalización canónica determinadas con el software IPA en las cuales participan los genes que resultaron del experimento de microarreglo (F-test, p≤0,05). Las vías de señalización canónica pertenecen a la base de datos Knowledge Data Base, Quiagen, que recopila datos experimentales publicados y las vías de señalización definidas en KEGG y BioCarta, entre otras.

Resulta interesante remarcar que las vías de señalización más representadas y con mayor significancia corresponden a las vías de degradación de neurotransmisores (dopamina, serotonina, melatonina, noradrenalina y adrenalina), a la transmisión de señales en terminales axónicas y a la señalización de la vía de Wnt/β-catenina (Figura 3.16). Los resultados relacionados con la degradación de neurotransmisores y señalización axónica sugieren un perfil de expresión de la línea celular Hek293 relacionado con un linaje neuronal. También se ve reflejado en las funciones biológicas de las Tablas 3.2 y 3.3, dónde se muestran funciones relacionadas con neurodiferenciación. neurodegeneración enfermedades neurológicas. У Tradicionalmente se ha aceptado que la línea celular Hek293 tiene origen embrionario renal humano. Los resultados encontrados en este ensayo de microarreglo con líneas celulares estables de Hek293 son consistentes con otros estudios recientes de secuenciación masiva y expresión génica de gran escala. Los ensayos reportados han identificado un perfil de expresión de esta línea celular compatible con un linaje neuronal, y no así con una célula de riñón. Las teorías propuestas indican que existe la posibilidad de por su origen embrionario, la potencialidad de estas células permita su diferenciación a células con cierto compromiso hacia un linaje neuronal luego de su inmortalización (136). Otra alternativa propuesta indicaría que las células Hek293 se habrían originado de una muestra de tejido de glándula adrenal, adyacente al riñón embrionario y con componente neuronal en la región medular de la glándula (136, 137).

La vía de señalización de Wnt/ β -Catenina comienza con la estimulación de receptores de membrana por glicoproteínas de la familia Wnt, y termina con la activación de regulador de la transcripción β -catenina. El rol de la señalización Wnt/ β -catenina ha sido ampliamente descripto en cáncer de colon, pero tiene un rol importante en la carcinogénesis de numerosos tumores (138). Adicionalmente, β -catenina puede interactuar con varios factores de transcripción y/o participar de la vía de señalización de éstos. Es así que la vía de Wnt/ β -catenina se entrelaza con la de NF- κ B (139), E2F (140, 141) y p53 (142).

Los resultados del ensayo de microarreglo también permitieron realizar un estudio de los posibles factores de transcripción río arriba de los genes expresados diferencialmente entre ambas líneas estables. La función *Gene Set Expression Comparisson* de la herramienta BRB array tools permitió comparar los genes expresados diferencialmente entre ambas líneas celulares con listas de genes agrupados según los factores de transcripción capaces de regular su expresión verificados experimentalmente (sección Materiales y Métodos). En la Tabla 3.4 se muestran los factores de transcripción hallados significativa con al menos uno de los 3 test estadísticos realizados (permutación LS/KS, test Efron-Tibshirani GSA). En este análisis se encontraron los factores de transcripción E2F4, p65, y AP-1, entre otros. En la presente tesis se han mostrado evidencias que sostienen una regulación de NF- κ B (Capítulo 2) y de E2F4 (Capítulo 3) por FKBP51. Adicionalmente, otra línea de trabajo de nuestro laboratorio ha encontrado una novedosa regulación de la familia de factores de transcripción AP-1 por FKBPs.



Figura 3.16. Vías de señalización canónica en las que participan los genes con expresión alterada en Hek293 FKBP51 respecto de Hek293 pCI-neo

Vías de señalización canónicas definidas por Quiagen Knowledge Base según Ingenuity Pathways (Quiagen, IPA), en las cuales participan los genes con expresión diferencial entre Hek293 FKBP51 y Hek293 pCI-neo. Las vías de señalización fueron determinadas por un F-test ($p \le 0.05$, test F) y ordenadas por significancia, de mayor a menor,

expresada como -log (p valor). El Ratio corresponde a la fracción de genes determinada experimentalmente que pertenecen a la categoría indicada respecto del total de los genes de dicha categoría. Los colores de las barras son asignados según el z-score calculado.

Referencias: z-score=0, blanco. Z-score negativo, azul. Z-score positivo, naranja. Línea naranja, ratio.

Factor de transcripción	ldentificador (TransFac)	Número de genes	Permutación LS p-valor	Permutación KS p-valor	Efron-Tibshirani's GSA test p-valor
ΑΡ-2 α	<u>T00035</u>	78	0.00134	0.03929	0.095 (-)
E2F-4	<u>T01546</u>	32	0.00179	0.03497	0.02 (-)
RAR-β	<u>T00721</u>	11	0.00192	0.00046	< 0.005 (-)
AP-1 (Fos – Jun)	<u>T00029</u>	54	0.00196	0.19279	0.04 (-)
ER-a	<u>T00261</u>	25	0.00264	0.06786	0.015 (-)
p53	<u>T00671</u>	56	0.00309	0.01247	0.055 (-)
RelA p65 –isoforma 1	<u>T00594</u>	19	0.00641	0.01258	< 0.005 (-)
c-Myc – isoforma 1	<u>T00140</u>	84	0.02203	0.0008	0.175 (+)

Tabla 3.3. Factores de transcripción capaces de regular la transcripción de los genes con expresión diferencial en células que sobreexpresan a FKBP51 respecto de las células control. Los factores de transcripción listados fueron determinados por el test de permutación LS/KS o Efron-Tibshirani's GSA de media máxima ($p \le 0,05$).

Los resultados obtenidos en este capítulo proponen que la sobreexpresión de FKBP51 genera un efecto estimulante de la proliferación y negativo sobre la muerte celular en células Hek293. Teniendo en consideración que numerosos tumores presentan expresión aumentada de FKBP51, los resultados obtenidos en este estudio podrían ser extrapolados a otros tipos celulares. FKBP51 es una proteína reguladora de la acción de NF-κB (Capítulo 2), y posiblemente también de la familia de factores de transcripción E2F (Capítulo 3). A la luz de los hallazgos realizados con el ensayo de microarreglo, se detectó que la sobreexpresión de FKBP51 tendría un impacto sobre la expresión de numerosos genes, y también ARNs no codificantes. El análisis bioinformático de los datos experimentales sugiere que FKBP51 podría regular sendas vías de señalización, no solamente relacionadas con procesos celulares de proliferación, muerte e invasión, sino también en la señalización propia de tejido neuronal. Es posible especular a partir de la conjunción de resultados y análisis presentados, que la sobreexpresión de FKBP51 podría tener un rol sobre diferentes vías de señalización, NF- κ B, E2F, Wnt/ β -catenina y AP-1, que aunque tradicionalmente son estudiadas como separadas entre sí, formarían parte de una red coordinada para regular la proliferación celular, el ciclo celular, la muerte y la proliferación.

<u>Discusión</u>

El presente trabajo de tesis doctoral aborda el estudio de la modulación del factor de transcripción NF-κB por proteínas FKBPs y evalúa nuevas funciones biológicas inherentes a FKBP51 y FKBP52. Los resultados experimentales obtenidos fueron presentados en tres capítulos. En el Capítulo 1 se estudió la modulación de NF-κB por FKBP52 sobre diferentes pasos de su cascada de activación, en el Capítulo 2 se realizó un análisis similar para la acción de FKBP51 sobre la función biológica de NF-κB, y en el tercer y último capítulo se ensayó la acción de FKBP51 y FKBP52 sobre la proliferación y muerte celular, completándose el análisis con un estudio de microarreglo.

El estudio de las IMMs resulta de especial relevancia ya que su actividad enzimática de PPIasa ejercida sobre proteínas plegadas las convierte en posibles interruptores moleculares para diferentes vías de señalización celular. Ha sido demostrado por ensayos de RMN que la isomerización de enlaces x-Pro es capaz de regular la acción de ciertas proteínas, mientras que para algunas otras proteínas existe evidencia indirecta de la importancia de este tipo de isomerización en diferentes procesos celulares.

Las proteínas FKBP51 y FKBP52 han sido las primeras proteínas FKBPs en ser descriptas como reguladores de la acción biológica de los RE (MR, GR, AR; ER, PR). En particular, nuestro laboratorio ha tenido una particular participación en la elucidación de los eventos que llevan a la activación y la transformación del heterocomplejo de GR (42). El modelo general de activación de los RE propone que FKBP51 interactúa con el heterocomplejo formado por proteínas Hsps (Hsp70 y Hsp90) en ausencia de estimulación con hormona. Luego de la estimulación, FKBP51 es intercambiada por FKBP52 (40, 45). La unión de FKBP52 a la proteína motora dineína posibilita el transporte retrógrado activo del heterocomplejo por la red de microtúbulos. Los ensayos muestran que en general, FKBP52 potencia la actividad transcripcional de los receptores y favorece la localización nuclear de los mismos. El dominio FK1 de FKBP52 con actividad enzimática, es necesario para la interacción con dineína, pero su actividad de PPlasa propiamente dicha no participa de la regulación de los RE (46). Por el contrario, FKBP51 inhibe la actividad transcripcional de los RE, con excepción de AR, y retrasa su translocación nuclear (35).

El objetivo central de este trabajo de tesis fue evaluar la posible regulación del factor de transcripción NF- κ B por FKBP51 y FKBP52, de manera similar a lo demostrado para los RE, pero en un sistema en el que el factor transcripcional no se asocia a Hsp90, lo que le confiere una mayor universalidad al mecanismo de acción de las IMMs antes demostrado. De forma análoga a estos receptores, el factor de transcripción NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma en ausencia de estímulo, y es transportado activamente por el complejo motor dineína/dinactina al núcleo luego de su activación (76). La chaperona Hsp90 forma parte del complejo de proteínas quinasas IKK (106, 107), y con el regulador de los RE y de NF- κ B, RAC3 (73), tal que si bien no interacciona directamente con las subunidades del heterodímero de NF- κ B y por ende no estaría involucrada en su retrotransporte, sí puede predecirse algún tipo de efecto dependiente de la chaperona en el resto de la cascada de activación. El conjunto de estas observaciones fue el puntapié inicial que motivó el estudio de la posible acción de FKBP51 y FKBP52 sobre la regulación de NF- κ B realizado en esta tesis doctoral.

Los primeros ensayos llevados a cabo en nuestro laboratorio y mostrados en la sección Introducción [sección Introducción, (34)] evidenciaron que existe una interacción directa (demostrada con proteínas purificadas) de la subunidad p65 de NF-κB con FKBP51 y FKBP52, así como una posible regulación transcripcional de NF-κB por estas proteínas. Estos hallazgos impulsaron la necesidad de estudiar los mecanismos involucrados en la novedosa regulación de NF-κB por proteínas FKBPs, así como la importancia de su actividad enzimática en estos procesos.

Modulación de NF-κB por *FK506-binding protein 52-kDa*.

Los primeros experimentos realizados demostraron que la activación transcripcional de NF- κ B (evaluada por ensayos de gen reportero) era potenciada por la sobreexpresión de FKBP52 de manera no exclusiva a la estimulación con PMA. Resultados similares a los hallados con PMA fueron encontrados mediante el tratamiento con TNF- α , tanto en ensayos de gen reportero como en la expresión de genes blanco de NF- κ B (Bax y MMP-9). También se han obtenido hallazgos similares en relación con la translocación nuclear de p65 en células tratadas con PMA (sección Introducción) y con TNF- α (Capítulo 1) luego de la sobreexpresión de FKBP52. La interacción entre FKBP52 y p65 ha sido demostrada no solo en células Hek293T, sino también en la línea celular Jurkat, como respuesta de la incubación con PMA, TNF- α y LPS: En resumen, los resultados recopilados a lo largo del Capítulo 1 muestran que la regulación de NF- κ B por

FKBP52 sería independiente del estímulo activador utilizado para los eventos que fueron evaluados dentro de su cascada de señalización.

Además de su efecto sobre la actividad transcripcional de NF-κB, los resultados obtenidos demuestran que FKBP52 participa en varios eventos dentro de la cascada de señalización del factor de transcripción. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta evidenciaron que la sobreexpresión de FKBP52 favorece la retención nuclear de p65 luego del tratamiento con TNF-α (Capítulo 1) o PMA. Los resultados observados luego de la estimulación con TNF-α muestran una mayor retención nuclear de p65 al menos por 30 min adicionales para células que sobreexpresan FKBP52 respecto a células transfectadas con el vector vacío. En el caso de los resultados presentados en la sección Introducción para células Hek293T tratadas con PMA y transfectadas con el plásmido de expresión para p65-HA, existe también un efecto de la sobreexpresión de FKBP52 sobre la retención nuclear de p65, pero de menor duración que el obtenido con TNF- α (15 min). Esta diferencia podría ser producto de la sobreexpresión de p65, o bien propia de cada estímulo activador. De forma similar a lo demostrado para NF- κ B, nuestro laboratorio ha reportado que la sobreexpresión de FKBP52 favorece la localización nuclear de MR luego de la estimulación de células Hek293T y COS-7. Debe comentarse que FKBP52 se asocia a proteínas del nucleoesqueleto como NuMA (tesis doctoral de Luciana Gallo), con las que co-purifica, anclando de esta manera a GR al núcleo. Ello nos ha hecho postular que esta IMM actuaría como puente molecular entre el factor de transcripción y las estructuras nucleares. Aún más, en células MEF knock out para FKBP52 no sólo se ve impedido el retrotransporte de MR y GR respecto de células MEF wild type (efecto revertido por la expresión exógena de FKBP52 (40)), sino que la población nuclear de receptor se ve fuertemente disminuida en las células KO. En el caso de GR, el silenciamiento de la inmunofilina FKBP52 inhibe la localización nuclear del receptor en neuronas frente al tratamiento con dexametasona (143).

Para ninguno de los factores de transcripción antes mencionados, según la evidencia acumulada con GR y MR, y los resultados obtenidos en esta tesis para NF-κB, la sobreexpresión de FKBP52 resultó en un incremento en la velocidad de translocación nuclear del factor de transcripción. Es posible que el nivel endógeno de FKBP52 ya sea suficiente para saturar el sistema de transporte activo dependiente de dineína, y que por lo tanto la sobreexpresión no resulte en un incremento de la velocidad de transporte retrógrado. A pesar de esto, la presencia de FKBP52 sería necesaria para el transporte

activo según se ha demostrado para los RE por silenciamiento de FKBP52 (143), aunque esto no ha sido aún ensayado para NF-κB. El incremento del tiempo de retención nuclear de MR, GR y NF-κB producto de la sobreexpresión de FKBP52 también podría ser consecuencia de diferentes mecanismos, como un una regulación negativa sobre el proceso de exportación nuclear y/o una potenciación de la interacción de los mencionados factores de transcripción con el ADN. En relación a esta última posibilidad, nuestro laboratorio ha demostrado por primera vez mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) que FKBP52 tiene la posibilidad de localizarse en secuencias promotoras, específicamente sobre secuencias de respuesta a NF-κB cercanas a la región codificante del gen de MMP-9 luego de la estimulación con PMA (34). En esta misma región promotora además se logró recuperar a la subunidad p65 de NF-κB (34). Es posible especular que la localización de FKBP52 en regiones promotoras podría estar relacionada con una regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B, o bien que FKBP52 participe en el reclutamiento de cofactores, remodeladores de la cromatina u otros factores que tengan influencia sobre la transcripción.

Algunos de los eventos tempranos dentro de la activación de canónica de NF- κ B comprenden **la fosforilación I** κ B α **y su posterior degradación**. Luego de la estimulación con diferentes agentes (PMA, TNF- α o LPS), se activan receptores y/o proteínas quinasa que terminan con la activación del complejo de quinasas IKK. La subunidad IKK β del complejo es encargada de fosforilar a I κ B α en dos residuos serina (Ser32 y Ser36). Existe evidencia que propone que hay una interacción entre el complejo IKK y Hsp90 (106, 107). El laboratorio de la Dra. Romano (Universidad de Naples Federico II, Italia) ha propuesto que IKK interactúa con la co-chaperona Cdc37 y con FKBP51 (105). A pesar de la gran similitud estructural entre FKBP51 y FKBP52, no se ha reportado que exista interacción entre IKK y FKBP52. En concordancia con esto, los experimentos de *Western blot* presentados en el Capítulo 1 revelados con anticuerpo anti-I κ B α y anti p- I κ B α sugieren que la sobreexpresión de FKBP52 no modula la fosforilación ni la degradación temporal de I κ B α . De estos resultados se puede postular que la regulación de NF- κ B por FKBP52 no estaría relacionada con una modulación de la fosforilación o degradación de I κ B α .

En el Capítulo 1 se ha determinado que la sobreexpresión de FKBP52 es suficiente para inducir la **acumulación de proteína p65**. Sin embargo, tanto los resultados de actividad transcripcional de NF-κB como los ensayos de inmunofluorescencia indirecta

no revelan que la sobreexpresión de FKBP52 sea suficiente para inducir la actividad transcripcional de NF-κB ni la translocación nuclear de p65 en ausencia de estímulo activador (como sí lo hace luego del tratamiento con PMA o TNF- α). La acumulación de p65 puede ser regulada por dos procesos contrapuestos: la degradación de proteína existente y la transcripción del ARNm correspondiente seguida de la síntesis de proteína de novo. La degradación de p65 cumple un rol crucial en el mantenimiento de los niveles proteicos de p65, pero también es relevante para una eficiente terminación de la transcripción mediada por NF-κB. La unión al ADN de NF-κB es un desencadenante de la ubiquitinación de p65, que resulta en la degradación y remoción del factor de transcripción de los sitios promotores. Numerosas evidencias resaltan que la inhibición de la degradación de p65 por tratamiento con inhibidores del proteasoma o con proteínas p65 recombinantes resistentes a ubiquitinación, resulta en una expresión sostenida de genes blanco de NF-κB específicos (85). Existe escasa información hasta el momento acerca de la regulación de la transcripción del gen RELA. La evidencia disponible indica que la expresión del ARNm de p65 puede ser regulada solo por dos proteínas, Sp1 y MDM2 (116).

En el presente trabajo se decidió poner a prueba la hipótesis que sostiene que la sobreexpresión de FKBP52 favorece la estabilidad de la proteína p65, teniendo en cuenta la conocida importancia de la degradación de p65 en la transcripción de genes blanco de NF-κB y en la permanencia sobre sitios promotores. La posible participación de FKBP52 en la estabilidad de p65 podría llegar a explicar el incremento en la actividad transcripcional y aumento en el tiempo de retención nuclear de p65 como consecuencia de la sobreexpresión de FKBP52. Los ensayos realizados en el Capítulo 1 mostraron que la transfección con el plásmido de expresión para FKBP52 favorece la acumulación de p65 aún en presencia puromicina, un inhibidor de la síntesis proteica. Además, la sobreexpresión de FKBP52 induce el incremento de los niveles proteicos de p65 endógeno y de p65 exógeno codificado por el vector de expresión p65-HA. Ambas evidencias obtenidas en esta tesis sugieren un rol de FKBP52 sobre la regulación de la estabilidad de p65. No obstante, esto no descarta que FKBP52 pudiese tener un efecto modulador sobre la transcripción del gen RELA o sobre la estabilidad de su ARNm, algo que aún no ha sido estudiado. El tratamiento con MG132 mostrado en el Capítulo 1 mostró un incremento en la acumulación de p65, mientras que el ensayo de ubiquitinación demostró que p65 es capaz de ser poliubiquitinada en las condiciones y el tipo celular estudiado. Ambos ensayos sugieren que la subunidad p65 del heterodímero se encuentra sujeta a ubiquitinación y a posterior degradación por el proteasoma; hallazgo que no se contradice con lo reportado con anterioridad (118). Entre las ubiquitina E3 ligasas conocidas para p65 se encuentran SOCS1, MKRN, PPAR-γ e ING-4 (87). CHIP (Carboxyl terminus of Hsc70-Interacting Protein) es una proteína con actividad de ubiquitina E3 ligasa conocida por regular la biodisponibilidad de diferentes factores de transcripción, entre ellos GR, p53 y tau. Además de su actividad enzimática, CHIP posee 3 dominios TPR de interacción a proteínas Hsp, entre las que se encuentran Hsp70 y Hsp90, pero solo la interacción con Hsp70 sería suficiente para inducir la degradación de proteínas cliente (144). En este trabajo, así como en otros resultados obtenidos por el laboratorio (34), más la evidencia bibliográfica reciente (118), se ha demostrado que p65 es capaz de unirse a Hsp70. No se conoce si CHIP podría formar parte del complejo Hsp70•p65, pero sí es sabido que la sobreexpresión de CHIP estimula la degradación de la proteína quinasa NIK (<u>NF-kB-inducing kinase</u>) y esto reprime la activación de la vía no canónica de NF-κB (145). El compendio de evidencias y los resultados obtenidos en esta tesis permiten especular que CHIP podría ser una proteína presente en el complejo Hsp70•p65, y que FKBP52 sería factible de favorecer la estabilidad de p65 por competir a través de su dominio TPR con la ubiquitina E3 ligasa CHIP por Hsp70. Ensayos de co-inmunoprecipitación y de estabilidad de p65 luego de la sobreexpresión de CHIP podrían poner a prueba esta nueva hipótesis en el futuro.

La **fosforilación de p65 en Ser536** es un hito dentro de la cascada de activación de NF- κ B y una marca de activación de p65. Esta modificación post-traduccional está asociada la potenciación de la actividad transcripcional de NF- κ B, a un incremento en la unión al co-activador p300, así como a una menor afinidad por I κ B α y a una disminución en la exportación nuclear mediada por I κ B α (113). La fosforilación puede ser catalizada por diversas proteína-quinasas, resultando en diferentes efectos biológicos según la enzima involucrada [IKK α , β y ε , NAK/TBK1 y RSK1, (113)]. Los ensayos de *Western blot* presentados en esta tesis y revelados con anticuerpo específico anti-p-p65 Ser536, mostraron una acumulación de p65 fosforilada en Ser536 luego de la sobreexpresión de FKBP52 en ausencia de estímulo externo. La fosforilación de p65 a lo largo del tiempo luego de la estimulación con PMA no se vio modificada por la sobreexpresión de FKBP52. La relación entre la cantidad relativa de proteína p65 y p-p65 Ser536, que se desprendió de las cuantificaciones correspondientes a los ensayos de *Western blot* en

células que sobreexpresan FKBP52 sin tratamiento con PMA, sugiere que FKBP52 induce la acumulación de p65, y en consecuencia también un acopio proporcional de pp65 Ser536. Además del ya mencionado incremento en los niveles proteicos de p65, FKBP52 favorece la acumulación de proteína p65 con la modificación post-traduccional en Ser536 que es considerada una marca de activación de NF-κB. Por lo tanto, estos resultados sugieren que FKBP52 no modula directamente la fosforilación de p65 en Ser536, pero sí favorece la acumulación de p65 y en forma proporcional, de p-p65 Ser536.

A partir de la recopilación de lo argüido a lo largo de la presente sección, es posible proponer que el efecto de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF-κB podría ser consecuencia de diferentes procesos. Es factible pensar que FKBP52 sería capaz de regular la actividad transcripcional de NF-κB a partir del reclutamiento de co-factores y co-activadores en sitios promotores. El efecto de FKBP52 sobre la actividad transcripcional de NF-κB también podría ser explicado por la acumulación de proteína p65 y de p-p65 Ser536. A pesar de que en ausencia de estímulo externo la sobreexpresión de FKBP52 no es suficiente para inducir la actividad transcripcional de NF-κB, la proteína p65 acumulada (p65 y p-p65 Ser536) podría luego de la llegada de estimulación con PMA o TNF- α translocar al núcleo y entonces sí traducirse en un incremento de la transcripción como consecuencia de la mayor disponibilidad del factor de transcripción. En este sentido, ha sido demostrado que la sobreexpresión de NF- κ B (146).

Según se ha demostrado a lo largo del Capítulo 1, **Ia actividad PPIasa de FKBP52** tiene un rol preponderante en la regulación ejercida por FKBP52 sobre NF- κ B. Ensayos de gen reportero y de PCR en tiempo real han permitido exponer que la actividad enzimática de PPIasa de FKBP52 tiene una importancia central en la estimulación de la actividad transcripcional de NF- κ B. Esto marca una diferencia crucial respecto a lo que ocurre en la regulación de los RE, dónde el domino FK1 de FKBP52 es necesario para su regulación pero no así su actividad enzimática. Los primeros ensayos que evaluaron el rol de la actividad enzimática de FKBP52 sobre la regulación de los RE mostraron que el tratamiento con FK506, así como una doble mutación puntual de FKBP52 (FD67DV) abolieron tanto la actividad PPIasa de FKBP52 como la potenciación de AR y GR (57). Estos hallazgos iniciales sugerían un rol importante de la actividad PPIasa de FKBP52 en la modulación de los RE. Sin embargo, es sabido que FK506 es un macrólido de

tamaño considerable que no interactúa exclusivamente con el bolsillo catalítico de las FKBPs, y que además los residuos F67 y D68 se encuentran en la boca del dominio PPIasa y no forman parte del bolsillo propiamente dicho. Experimentos realizados posteriormente, corrigieron este problema y demostraron mediante mutantes puntuales de FKBP52 sin actividad enzimática en los residuos W90, F130 (ubicados en el bolsillo hidrofóbico del dominio), F67 y Y57, que la pérdida de actividad de PPIasa no se traduce en una abolición del efecto potenciador de los RE (56).

Hallazgos inéditos de esta tesis mostraron que no sólo el tratamiento con FK506, sino también la sobreexpresión de mutantes puntuales de FKBP52 en F67 y F130 (FKBP52 F67Y y FKBP52 F130Y) provocan una disminución en la actividad transcripcional de NF- κ B respecto de FKBP52 *wild type*. FKBP52 participa de la regulación de varios factores de transcripción, pero en ninguno de estos casos (a excepción de NF- κ B) su actividad de PPIasa resulta relevante para la regulación biológica de dichos factores. El rol de la actividad PPIasa de FKBP52 sobre la activación de NF- κ B constituye la primera función biológica descubierta hasta el momento para esta actividad. Dado que no se conocen otras implicancias asociadas a la actividad de PPIasa de FKBP52, su bolsillo catalítico resulta un blanco farmacológico prometedor para el diseño de inhibidores que busquen disminuir con cierta especificidad la actividad biológica de NF- κ B.

Al igual que fue determinado para FKBP52 *wild type*, la sobreexpresión de FKBP52 F130Y no perturbó la **fosforilación de l** κ B α ni su degradación temporal luego del tratamiento con PMA respecto de células transfectadas con el vector vacío. Estos resultados fortalecen la propuesta de que FKBP52 no participaría en la fosforilación ni degradación de l κ B α .

Adicionalmente, la actividad de PPIasa de FKBP52 ha resultado importante en la acción de FKBP52 sobre la **retención nuclear de p65** evaluada por inmunofluorescencia indirecta. Los resultados presentados en esta tesis muestran que la localización nuclear de p65 no se ve modificada por la sobreexpresión de FKBP52 F130Y respecto al grupo de células transfectadas con el vector vacío, a diferencia de lo que ocurre con FKBP52 *wild type.* Se sugiere entonces que la actividad PPIasa de FKBP52 es necesaria para el incremento de la retención nuclear de p65. El mecanismo involucrado no ha sido dilucidado hasta el momento, pero entre las posibilidades existentes, podría proponerse que la actividad enzimática de FKBP52 desfavorecería la exportación de p65, o bien

potenciaría la interacción del factor de transcripción con el ADN, entre otras. La sobreexpresión de FKBP52 F130Y no generó una **acumulación de proteína p65**. Los resultados obtenidos permiten sugerir que la actividad PPIasa de FKBP52 también es necesaria para estimular el incremento de los niveles de p65.

En resumen, la **actividad enzimática de PPIasa de FKBP52** resultó ser protagonista de la acción de FKBP52 sobre NF- κ B en diferentes pasos dentro de su activación: la actividad transcripcional y la expresión de genes blanco, la retención nuclear de p65, y la acumulación de proteína p65. Como se ha detallado en la sección Introducción, el estudio de la isomerización de enlaces X-Pro en proteínas plegadas es complejo y su confirmación definitiva requiere la realización de proteínas mutante en los residuos prolina candidato y ensayos de RNM como confirmación. La actividad PPIasa de FKBP52 podría tener como blanco a la subunidad p65 de NF- κ B o bien a alguna otra proteína que participe de la regulación del factor de transcripción.

Ensayos con proteínas recombinantes realizados por Ryo, *et al* (13) demuestran que la IMM perteneciente a la familia de las Parvulinas con actividad de PPIasa, Pin-1, isomeriza el enlace x-Pro (Pro 255) de p65 y en consecuencia regula su estabilidad y su retención nuclear. Pin-1 tiene la capacidad de isomerizar un motivo específico (Ser/Tre-Pro fosforiladas) lo cual facilita el estudio de sus proteínas blanco y la identificación de los residuos involucrados. La proteína p65 cuenta con dos secuencias posibles de ser blanco de la acción enzimática de Pin-1, Tre-Pro 255 y Ser-Pro 317. Los ensayos de mutagénesis realizados por los autores demuestran que solo el residuo Pro 255 es necesario para la interacción con Pin-1 (13).

En contraposición a Pin-1, no se ha determinado ningún motivo blanco de la actividad PPIasa de FKBP52. En consecuencia, la identificación de secuencias modificadas por isomerización para esta Inmunofilina resulta de mayor complejidad que para su paráloga Pin-1. Estudios de la actividad enzimática de la FKBP arquetípica, FKBP12, realizados con péptidos recombinantes han permitido proponer alguna preferencia de las FKBPs por sus secuencias blanco (147). Las conclusiones derivadas de estos ensayos sugieren que las FKBPs tienen alguna especificidad sobre el residuo precedente a una prolina, con predilección por aminoácidos hidrofóbicos. Los aminoácidos con carga negativa (Asp y Glu) posicionados tanto antes como después del residuo Pro, disminuyen la actividad de isomerasa de las FKBPs (147).

Ensayos de co-inmunoprecipitación de p65 con proteína purificada FKBP52 recombinante (GST-FKBP52) realizados por nuestro laboratorio, sugieren una interacción directa entre el factor de transcripción y la IMM (34). Diferentes hallazgos permiten proponer que p65 podría ser modificada por isomerización por FKBP52, entre los que se encuentran: la evidencia conocida acerca de la isomerización de p65 por Pin-1 (13), la interacción entre p65 y FKBP52 [Capítulo 1; (34)], y la exposición realizada en esta tesis acerca del rol crucial de la actividad PPIasa de FKBP52 sobre la retención nuclear y acumulación de p65. Con el fin de determinar la posible presencia de residuos prolina de p65 humana capaces de ser isomerizados, en la sección Materiales y Métodos se realizó el estudio de la secuencia aminoacídica de dicha proteína. Existen cuatro isoformas de p65 humana que resultan de variantes de *splicing* o sitios de poliadenilación alternativos de la isoforma 1. La isoforma 1 presenta la mayor cantidad de aminoácidos, y por lo tanto fue elegida para el análisis de secuencias realizado.

La proteína p65 humana cuenta con 73 residuos prolina. Con el fin de acotar el número de residuos posibles de ser isomerizados, se estudió la conservación de estos aminoácidos a lo largo de diferentes especies [(23 proteínas de mamíferos, incluyendo primates, caninos, felinos, mamíferos acuáticos, roedores voladores y roedores terrestres, 2 especies de peces, 1 reptil, 1 anfibio, 2 aves y 1 invertebrado), sección Materiales y Métodos]. FKBP52 es una proteína ubicua que cuenta con homólogos en vertebrados e invertebrados. La proteína homóloga a FKBP52 humana en Drosophila melanogaster recibe el nombre de FKBP59, y si bien presentan un bajo porcentaje de identidad de secuencia en general (46%), existe alta homología entre los dominios con actividad enzimática de ambas. A partir de las secuencias proteicas seleccionadas para p65 se realizó un alineamiento múltiple y se determinó el grado de conservación de la secuencia de p65 con la herramienta Clustal Omega (148). Se estima que tanto la conservación de los residuos prolina como de los aminoácidos contiguos se puede considerar indicativo de la existencia de una función biológica asociada a dicha región. De las 73 prolinas presentes en p65, solo 10 residuos presentan un grado de conservación igual a 100%, o el máximo posible si se toma en consideración que algunas regiones tienen menor representación por haber utilizado secuencias aminoacídicas parciales (prolinas en las posiciones Pro 47, 59, 82, 85, 87, 182, 255, 275, 290 y 344 de la secuencia de referencia, p65 humana: NP_068810.3). En general, el segundo dominio funcional de p65, el dominio de transactivación o TAD (aminoácidos 300 a 524 de p65 humana NP_068810.3), presenta menor grado de conservación que el resto de la proteína, y por lo tanto menor presencia de residuos prolina conservados. La Pro 255 reportada como blanco de la isomerización por la Inmunofilina Pin-1 (13) mostró un porcentaje de conservación igual al 100% para el alineamiento múltiple realizado.

Adicionalmente, en esta tesis se evaluó la conservación de la región circundante a las prolina candidato, especialmente de su aminoácido precedente, y en menor medida el aminoácido posterior, según la evidencia reportada por Schimdpeter *et al* (147) para la actividad PPIasa de FKBPs. En general, las regiones en la que se encuentran estas prolinas presentan alto grado de conservación. Únicamente, la Pro 82 carece de conservación en su residuo anterior, mientras que las Pro 290 y 344 no muestran conservación del aminoácido posterior. Todas las prolinas estudiadas se ubican además en regiones de estructura secundaria flexibles como *loops* o *beta turns,* según se pudo apreciar a partir de diferentes estructuras depositadas en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB id: 10y3, 1ram, 2i9t y 3doy) con el software de visualización VMD 1.9.2 (NIH), las cuales en su conjunto presentan una cobertura de la secuencia de referencia desde el aminoácido en la posición 10 hasta 293.

Según el análisis bioinformático realizado ha sido posible acotar el número de residuos prolina de p65 humana posibles de ser isomerizados de 73 a 10. La identificación final de la prolina de p65 blanco de FKBP52 necesita de la realización de diferentes pasos experimentales como los que se proponen a continuación que involucran la realización de proteínas recombinantes y su purificación. Primero, sería necesario estudiar la interacción de FKBP52 con diferentes dominios estructurales de p65 a partir de proteínas recombinantes para determinar la región/es involucradas en la interacción. En segundo lugar, según el resultado del ensayo de interacción, se podría proceder a realizar proteínas mutantes de p65 en los diferentes residuos prolina determinados como candidatos por el análisis bioinformático en la región interactuante con FKBP52. Con estas nuevas proteínas mutante de p65 se podría estudiar nuevamente la interacción entre las proteínas mutantes y la Inmunofilina, así como las funciones biológicas asociadas a estas mutantes, como ser: su retención nuclear, actividad transcripcional y estabilidad. Otro posible enfoque podría involucrar la síntesis de péptidos cromogénicos de alrededor de 10 aminoácidos de longitud con la secuencia de p65 humana que permitan estudiar la actividad de PPIasa de FKBP52 in vitro.

Además del dominio FK1 con actividad de PPIasa, FKBP52 cuenta con **repeticiones de dominios TPR** en su región C-terminal capaces de interactuar con proteínas de choque térmico. Ensayos *in vitro* demostraron que FKBP52 tiene una

afinidad preferencial por Hsp90 (Hps90 α : 1,61 ± 0,36 μ M; Hsp90 β : 1,02 ± 0,12 μ M) frente a Hsp70 (Hsp72: >75 μ M; Hsc70: >75 μ M)(51). Los ensayos de gen reportero realizados mediante la co-expresión de FKBP52 wild type y un péptido codificante para un dominio TPR recombinante mostraron una pérdida de la potenciación de la actividad transcripcional de NF-κB por la sobreexpresión péptido flag-TPR. Adicionalmente, ensayos de gen reportero con la proteína mutante FKBP52 K354A sin capacidad de unión a Hsp90, mostraron una reducción parcial del efecto potenciador de la actividad transcripcional de NF-κB registrada para FKBP52 *wild type.* A pesar de esto, los ensayos de co-inmunopreciptación entre p65 y proteínas de choque térmico realizados en esta tesis y por Erlejman et al (34) demuestran que p65 es capaz de interactuar con Hsp70, pero no así con Hsp90. Es posible que la proteína mutante FKBP52 K354A tampoco sea capaz de interactuar con Hsp70, ya que esto no ha sido demostrado hasta el momento, y que por lo tanto el efecto de la mutante y de la sobreexpresión del dominio TPR recombinante sobre NF-kB sea consecuencia de la disrupción en la interacción entre FKBP52 y Hsp70. Otra posibilidad sugiere que la falta de interacción entre Hsp90 y FKBP52 afecte a diferentes co-factores transcripcionales reclutados en sitios promotores esenciales para la transcripción génica. Hsp90 tiene la habilidad de interactuar con numerosas proteínas cliente con dominios TPR que incluyen factores de transcripción, remodeladores de la cromatina, proteínas quinasas, entre otros (149).

La actividad de NF- κ B se encuentra exacerbada en diferentes **neoplasias y líneas celulares humanas cancerosas** (78). En particular, en leucemia linfoblástica aguda se han detectado complejos de NF- κ B constitutivamente activos (150). Los procedimientos actuales aceptados para el tratamiento de esta patología comprenden una serie de ciclos de quimioterapia, con la posibilidad de un trasplante autólogo de médula ósea. Los diferentes pasos del tratamiento se clasifican en inducción, consolidación y mantenimiento. En la mayoría de las líneas de tratamiento existentes, los corticosteroides forman parte del procedimiento, en combinación con otros agentes como pueden ser: vincristina, ciclofosfamida, derivados de doxorrubicina, antraciclina, metotrexato, o anticuerpos monoclonales, entre otros (151). Adicionalmente, estos fármacos pueden ser administrados junto con inhibidores del proteasoma como Bortezomib (152). Tanto los corticosteroides como los inhibidores del proteasoma tienen un efecto inhibitorio sobre la acción de NF- κ B. Los primeros tienen efecto por represión del factor de transcripción sobre los sitios de respuesta κ B, mientras que los segundos actúan inhibiendo la degradación de la proteína inhibitoria $I\kappa B$ (90). La necesidad de generar nuevos tratamientos para leucemia aguda, así como para otras neoplasias hematológicas motivó en esta tesis el estudio de la regulación de NF- κB por proteínas FKBPs en la línea celular Jurkat.

En el Capítulo 1 se ha demostrado que la interacción entre p65, FKBP52 y Hsp70 ocurre tanto en células Hek293T como células Jurkat, una línea celular obtenida a partir de sangre periférica de un paciente con leucemia linfoblástica aguda. Como se ha mencionado con anterioridad. FK506 es un macrólido con efecto inhibitorio sobre la actividad PPlasa de proteínas FKBPs y acción inmunosupresora, el cual se utiliza frecuentemente en pacientes que han sido sometidos a trasplante de órganos. Los resultados mostrados en esta tesis sugieren que el tratamiento con FK506 generó una disminución de la expresión de MMP-9 por Western blot en la línea celular Jurkat, en concordancia a lo observado en Hek293T. La acción de MMP-9 está involucrada en la angiogénesis, la migración celular y en la progresión de neoplasias, por lo que esta proteína resulta un blanco farmacológico ampliamente estudiado en el tratamiento contra el cáncer. Además, se ha demostrado recientemente que MMP-9 es relevante en la leucemia linfoblástica crónica debido a sus efectos sobre la migración celular y la apoptosis (125-127). En este sentido, una disminución en los niveles proteicos de MMP-9 en la línea celular Jurkat luego del tratamiento con FK506 puede ser considerado un efecto prometedor para evaluar posteriormente a este macrólido como posible tratamiento de leucemia aguda.

En su conjunto, los resultados obtenidos en ambas líneas celulares sugieren que la actividad PPIasa de FKBP52 podría ser un blanco farmacológico en el tratamiento de leucemia, y que FK506 podría ser uno de los fármacos a evaluar a futuro. Además de ser un agente inmunosupresor, FK506 muestra acción neurotrófica (59) y capacidad de regeneración de nervios periféricos en ratas (153). Esta propiedad secundaria podría ser positiva en el tratamiento de leucemia, ya que existe una alta incidencia de neuropatía periférica en estos pacientes (154).

Los resultados expuestos en el Capítulo 1 de esta tesis doctoral demuestran que existe una regulación de NF-κB por FKBP52 dependiente de su actividad enzimática y sugieren a esta inmunofilina como un blanco farmacológico para el tratamiento de neoplasias donde la actividad de NF-κB se encuentre exacerbada. Además, se han encontrado funciones novedosas para FKBP52 desconocidas hasta el momento.

Adicionalmente, han surgido nuevas hipótesis de trabajo a partir de los resultados obtenidos que podrían resultar en nuevos descubrimientos que involucren a FKBP52 y NF-κB.

Modulación de NF-kB por FK506-binding protein 51-kDa.

Los hallazgos realizados en el Capítulo 1 proponen una regulación de NF-κB por FKBP52, en cierta forma similar a la observada para los RE. En el modelo de activación de estos receptores se muestra que existe una regulación por FKBP51 antagónica a la ejercida por FKBP52. Teniendo en consideración esta información, así como las evidencias conocidas que relacionan a FKBP51 y a Hsp90 con el complejo de quinasas IKK (105), se decidió evaluar la contribución de FKBP51 a la regulación del factor de transcripción NF-κB. Los descubrimientos realizados en esta materia se presentaron a lo largo del Capítulo 2.

Los primeros ensayos realizados en el laboratorio consistieron en el estudio de la actividad transcripcional de NF-κB por medio de ensayos de gen reportero en células Hek293T que sobreexpresaban a FKBP51 y tratadas con PMA (sección Introducción). El resultado obtenido permitió proponer una acción inhibitoria de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF-κB. En este sentido, resultados comparables fueron adquiridos por ensayos de gPCR para la expresión del ARNm de MMP-9 en células transfectadas con el vector de expresión para FKBP51 y tratadas con PMA. Con el fin de determinar si el efecto de FKBP51 sobre esta actividad era dependiente del estímulo activador utilizado, se decidió repetir el ensayo de gen reportero en células tratadas con TNF-α (Capítulo 2). Los resultados indicaron nuevamente que la sobreexpresión de FKBP51 presentaba un efecto inhibitorio de la actividad transcripcional. La acción de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF-κB resulta independiente del estímulo activador utilizado (PMA o TNF- α). Una interpretación similar fue realizada a partir de los ensayos de translocación nuclear de p65 por inmunofluorescencia indirecta. La sobreexpresión de FKBP51 generó un retraso en el transporte retrógrado de p65 respecto de las células transfectadas con el vector vacío independientemente del estímulo utilizado (PMA en la sección Introducción y TNF-α en el Capítulo 2). En el caso de los RE se encuentra aceptado que el intercambio de FKBP51 por FKBP52 en el heterocomplejo favorece la translocación del receptor; mientras que por el contrario, la sobreexpresión de FKBP51 desplaza a FKBP52 del complejo y por lo tanto genera un retraso en el transporte

Discusión

retrógrado del RE. FKBP51 presenta alta similitud estructural y de secuencia con FKBP52 que le permitiría competir en la unión a ciertas proteínas. La inhabilidad de FKBP51 por interactuar con la proteína motora dineína, se considera responsable de este retraso en el transporte retrógrado de los RE. Por analogía al modelo de activación de los RE, es coherente proponer que FKPB51 podría competir con FKBP52 por p65 y que esto resultaría en un retraso de la translocación nuclear del factor de transcripción. Esta idea está también avalada por ensayos que mostraron que FKBP51 **co-inmunoprecipita con p65** en ausencia de estímulo, y que luego de la activación con PMA, la interacción con FKBP52 se ve favorecida en detrimento de FKBP51. Estos ensayos fueron realizados en la línea celular Jurkat en el Capítulo 2, y en Hek293T según fue mostrado en Erlejman *et. al.* (34)

Los ensayos de la actividad transcripcional de NF-κB para células transfectadas con el vector de expresión para FKBP51 y tratadas con FK506 y PMA, mostraron que el tratamiento con el macrólido no tuvo efecto sobre la acción inhibitoria de FKBP51. Estos resultados sugieren que la **actividad PPIasa de FKBP51**, a diferencia de lo que ocurre con la actividad PPIasa de FKBP52, no participaría de su efecto sobre NF-κB. Adicionalmente, la sobreexpresión de la mutante de FKBP51 sin actividad enzimática (FKBP51 FD67/68DV) mostró inhibición de la actividad transcripcional de NF-κB similar a la de FKBP51 *wild type*. En su conjunto, los hallazgos realizados en el Capítulo 2 demostraron que la actividad PPIasa de FKBP51 no participaría de la regulación de la actividad transcripcional de este factor de transcripción.

Adicionalmente, ensayos de gen reportero realizados con otra mutante puntual de FKBP51, pero sin **capacidad de unión a Hsp90** (FKBP51 K352A) mostraron resultados similares a los obtenidos con FKBP51 *wild type*. Por el contrario, la sobrexpresión del péptido recombinante *flag*-TPR y de FKBP51 mostró una pérdida de la capacidad inhibitoria de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B. La interacción con esta chaperona parecería no ser relevante en la regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B, pero la sobreexpresión del péptido TPR recombinante podría estar disrumpiendo la interacción de Hsp90 con otras proteínas con dominios TPR que tendían influencia sobre la regulación de NF- κ B.

Los resultados antes enunciados, motivaron el estudio de los mecanismos involucrados en la acción inhibitoria de FKBP51 encontrada sobre NF- κ B. Algunos de los eventos tempranos que ocurren durante la activación de NF- κ B incluyen **la**

fosforilación y degradación de IκBα. En esta materia, ya había sido demostrado que el tratamiento con diferentes inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90 como geldanamicina y radicicol disminuían la actividad quinasa del complejo IKK formado por IKK $\beta/\alpha/\gamma$ (155). Trabajos posteriores mostraron que el complejo de guinasas está también conformado por Hsp90 a través de la proteína Cdc37. Adicionalmente se evidenció que existía un reclutamiento transitorio de FKBP51 al complejo (106). Los resultados presentados en el Capítulo 2 mostraron que la sobreexpresión de FKBP51 en la línea celular Hek293T, no generaba ninguna variación en la velocidad de fosforilación y degradación de IκBα respecto de las células transfectadas con el vector vacío. En su conjunto, estos descubrimientos podrían sugerir que FKBP51 es un componente necesario en la conformación del complejo de quinasas IKK, pero que la sobreexpresión no aumentaría la actividad quinasa de IKK. La fosforilación de p65 en Ser536, considerada como un hito de activación de NF-kB, tampoco fue modificada por la sobreexpresión de FKBP51. Ambos resultados podrían considerarse complementarios, ya que una de las proteínas encargadas de fosforilar a p65 en Ser536 incluye al complejo IKK, aunque también hay otras quinasas posibles como NAK/TBK1 y RSK1 [sección Introducción, (84, 86)].

En contraposición a lo encontrado para FKBP52, la sobreexpresión de FKBP51 no generó cambios en los **niveles de proteína p65**. Por lo tanto, no hay razones para pensar que FKBP51 podría estar involucrada en la estabilidad ni en la expresión de p65.

El modelo que resulta de los resultados obtenidos para FKBP51 propone que esta IMM tendría un efecto inhibitorio de la actividad transcripcional de NF- κ B. En ausencia de estímulo se espera que la población mayoritaria de p65 se encuentre formando parte de un complejo con FKBP51, y que luego de la estimulación exista un intercambio de IMMs. Este mecanismo explicaría el retraso observado en la translocación nuclear de p65 luego de la sobreexpresión de FKBP51. Teniendo en cuenta que no se encontraron efectos de la sobreexpresión de FKBP51 sobre los niveles proteicos de p65, la fosforilación de p65 en Ser536, ni sobre la fosforilación y degradación de I κ B α , es posible que la acción inhibitoria de FKBP51 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B sea producto en cierta medida del retraso en el transporte retrógrado de este factor de transcripción. Sin embargo, es difícil pensar que el retardo en la localización nuclear de p65 por FKBP51 sea el único responsable de la fuerte inhibición sobre la actividad transcripcional de NF- κ B por diferentes razones: la permanencia nuclear de p65 luego del tratamiento con PMA es un evento de corta duración, y en el caso de la estimulación con TNF-α (si bien la acumulación nuclear de p65 es siempre menor al grupo transfectado con el vector vacío) la variación con las células de referencia muestra solamente una diferencia significativa alrededor del 20%. Resultados adicionales obtenidos por nuestro laboratorio demostraron que existe un reclutamiento de FKBP51 sobre el sitio promotor del gen MMP-9 en la región de respuesta a NF-κB (34), que podrían indicar una regulación de esta IMM directamente sobre el reclutamiento de co-activadores y/o co-represores de la transcripción.

En líneas celulares de melanoma, se ha establecido que la expresión de FKBP51 se encuentra incrementada. Hallazgos realizados en estas células por el laboratorio de la Dra. Romano (Universidad Federico II de Nápoles, Italia) indican que el silenciamiento de FKBP51 disminuye la actividad transcripcional de NF-κB y la actividad quinasa de IKK detectada por un ensayo *in vitro* de fosforilación de IkBa. Las conclusiones alcanzadas por este grupo de trabajo mediante el silenciamiento de FKBP51 proponen a esta IMM como un agente estimulante de la acción de NF-kB (31, 105). Los resultados presentados muestran que es posible que la regulación ejercida por FKBP51 sobre NF-κB sea dependiente del tipo celular evaluado. Por otro lado, es admisible que FKBP51 sea necesaria para la correcta formación del complejo de guinasas IKK, tal como se había determinado también con anterioridad (106), y que, por lo tanto, el silenciamiento de FKBP51 perturbe este complejo y resulte en una alteración en la vía de activación de NF- κ B. A pesar de esto, a la luz de los resultados obtenidos en los Capítulos 1 y 2, no es posible sostener la afirmación aseverada por este grupo de trabajo sobre la actividad PPlasa de FKBP51. Los experimentos presentados en estos trabajos (31, 60, 105) aseguran que el tratamiento con inhibidores de la actividad PPIasa (FK506 y rapamicina) disminuyen la actividad transcripcional de NF-κB por su acción sobre FKBP51. Tanto en la sección Introducción como a lo largo de los Capítulos 1 y 2 se ha hecho hincapié en la falta de especificidad de estas drogas por proteínas FKBPs específicas. En la sección Introducción también se ha mostrado (Tabla I.2) que la afinidad de rapamicina y FK506 por ambas IMM es similar (Ki FKBP51^{rapa}: 10-15 nM, Ki FKBP52^{rapa}: 10 nM; Ki FKBP51^{FK506}: 3,7 nM, Ki FKBP52^{FK506}: 4,2 nM). Además, los experimentos realizados con mutantes puntuales de FKBP51 y FKBP52 sin actividad enzimática de PPIasa mostraron que la actividad PPlasa de FKBP52 estaba involucrada en diferentes pasos de la activación de NF-kB, mientras que la de FKBP51 no tenía efecto en ensayos de gen reportero. Los resultados obtenidos por el grupo de la Dra. Romano con FK506 y rapamicina podrían ser explicados por la acción de FKBP52 en la señalización de NF-κB demostrada en esta tesis.

A modo de síntesis, en la Figura D.1 se presenta un esquema del modelo **propuesto** para la regulación del factor de transcripción NF-κB por FKBPs. El complejo IKK interactúa con la chaperona Hsp90, con cdc37 y con FKBP51 (105, 106, 155). Es posible que la interacción entre IKK y FKBP51 sea de carácter transitorio y ocurra un intercambio entre FKBP51 y cdc37 (106). En ausencia de activación, el heterodímero p65•p50 se encuentra anclado en el citoplasma por la proteína inhibitoria IκBα y unido a FKBP51. Luego de la estimulación con diferentes agentes (PMA, TNF-α, LPS), el complejo de guinasas IKK es activado y este fosforila a IkBa. La fosforilación de IkBa induce su degradación por el proteasoma 26S y la liberación del heterodímero p65•p50. Entonces, FKBP51 es reemplazada por FKBP52 en el complejo formado por el factor de transcripción y Hsp70, lo que favorecería la interacción del factor de transcripción con la proteína motora dineína y el retrotransporte del heterodímero. El resultado de esta regulación es una estimulación de la actividad transcripcional de NF-κB por FKBP52 y una acción opuesta por FKBP51. La actividad enzimática de PPlasa de FKBP52 es crucial en la regulación ejercida sobre este factor de transcripción. FKBP52 actúa favoreciendo la acumulación de p65 posiblemente por estabilización de esta proteína y la retención nuclear del factor de transcripción. FKBP52 no participa de la regulación de la actividad quinasa del complejo IKK ni en la degradación de ΙκΒα. Es posible que p65 sea blanco de la actividad PPIasa de FKBP52, y que esto induzca una modificación sobre el factor de transcripción que inhiba su degradación proteasomal, de forma análoga a lo que ocurre con p65 y la isomerasa pin-1. Esto último convierte a la actividad PPIasa de FKBP52 en un posible blanco farmacológico para la inhibición del factor de transcripción, lo cual pudo ser verificado por el tratamiento con FK506. La acción de FKBP51 y FKBP52 también podría ser explicada por un mecanismo regulatorio en las regiones promotoras blanco de NF-kB sobre el reclutamiento de co-factores, co-activadores y/o co-represores transcripcionales (34).



Figura D.1: Esquema del modelo propuesto. Referencias: 51: FKBP51; 52: FKBP52; 70: Hsp70; 90: Hsp90; Dyn: dineína.

Los resultados presentados en los Capítulos 1 y 2 mostraron una regulación novedosa del factor de transcripción NF-κB por proteínas FKBPs. NF-κB regula la transcripción de genes involucrados en procesos clave en la progresión del cáncer como proliferación, ciclo celular, apoptosis, inflamación, e invasión, entre otros. Por este motivo, en el Capítulo 3 se propuso el estudio de la acción de FKBP51 y FKBP52 sobre la proliferación y muerte celular. Tal como se ha mencionado en la sección Introducción, es sabido que FKBP51 exhibe una expresión aumentada en numerosos tipos de tumores humanos y líneas celulares cancerosas. FKBP52, por otro lado, muestra un aumento en sus niveles de expresión en un número más reducido de tipos de cáncer que incluyen, hepatoma maligno, leucemia de células T y tumores dependientes de hormona (cáncer de próstata, mama y útero).

En el Capítulo 3 se evaluó el efecto de la sobreexpresión de las inmunofilinas **FKBP51 y FKBP52 en la muerte y proliferación celular** de células Hek293. Se decidió continuar este tipo de ensayos en células Hek293, ya que los hallazgos realizados acerca de la señalización de NF-κB habían sido realizados en su mayoría en Hek293T. Para estos experimentos, no fue posible la utilización de Hek293T por la imposibilidad de generar líneas celulares estables de Hek293T con el antibiótico de selección G418, tal

Discusión

como se pormenorizó en el Capítulo 3. Esta línea celular establecida a partir tejido embrionario de riñón, no tiene origen tumoral, y por lo tanto muestra una expresión relativamente moderada de FKBP51 (32) y FKBP52 (en comparación con líneas celulares tumorales). Adicionalmente, presenta la ventaja de mostrar una alta eficiencia de transfección con métodos sencillos, económicos y de baja toxicidad. Por otro lado, es importante tener en consideración, que las conclusiones obtenidas en este modelo celular no pueden ser directamente extrapolados a ningún tipo de cáncer o tumor sin antes ser evaluados en el modelo celular correspondiente. Ya ha sido demostrado, que FKBP51 puede tener roles antagónicos según el tipo celular: la expresión disminuida de FKBP51 en cáncer de páncreas correlaciona una mayor resistencia a tratamientos quimioterapéuticos (33), mientras que su sobreexpresión en melanoma está asociada a una mayor agresividad del tumor (105).

En resumen, en el Capítulo 3 se mostró que la sobreexpresión de FKBP52 tiene un efecto estimulador moderado de la muerte celular luego del tratamiento con peróxido de hidrógeno, y no presentó resultados detectables sobre la proliferación (recuento de células viables) ni el metabolismo celular (ensayo de MTT). FKBP51, por el contrario, y en coincidencia con resultados previos de nuestro laboratorio, mostró un efecto estimulante sobre la proliferación celular y una disminución significativa de la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno o estaurosporina. El resultado de la acción de FKBP51 fue estudiado mediante diferentes enfoques. Se realizaron transfecciones estables y transitorias con el plásmido codificante para FKBP51, y se utilizaron diferentes técnicas para medir la proliferación celular (MTT, recuento de viables, marcación con CFSE). También se revirtió la sobreexpresión de FKBP51 con un plásmido shRNA específico

En general se acepta que la activación de NF- κ B se correlaciona con una inhibición de la apoptosis y un aumento en la supervivencia celular (109). Sin embargo, esta simplificación no es exacta. NF- κ B puede tener una acción dual sobre la muerte celular, dependiendo del tipo celular, los genes blanco involucrados en la respuesta y los estímulos utilizados (156-158). En Hek293 se ha propuesto mediante la sobreexpresión del coactivador de NF- κ B, RAC3, que la activación de este factor de transcripción se correlaciona con inhibición de la apoptosis (73, 159) e inducción de la capacidad tumorigénica (160). En síntesis, la proliferación y muerte celular son procesos complejos, que difícilmente puedan ser explicados por la modulación de una única vía de

señalización. Por este motivo, en el Capítulo 3 se decidió abordar la posibilidad de que las FKBPs pudiesen regular también la actividad transcripcional de una familia de factores fuertemente relacionados con la progresión del ciclo celular, la proliferación, la apoptosis y con NF-κB. Como ya fue mencionado en el Capítulo 3 y en la sección Introducción, NF-κB y E2F ejercen una acción inhibitoria entre sí, y regulan de forma coordinada el ciclo celular y la apoptosis.

Ensayos de gen reportero proponen que FKBP51 y FKBP52 podrían tener una acción estimulante de la actividad transcripcional de E2F1-4. En el caso de FKBP52 también se estudió la importancia de su actividad PPIasa en este efecto, obteniéndose resultados similares a NF-κB. De forma análoga a NF-κB, los factores de transcripción E2F pueden tener roles duales en relación con la muerte celular, proliferación y diferenciación celular, que dependerán del contexto celular, los estímulos involucrados y la expresión de genes blanco específicos. No es posible predecir cuál de estos dos factores podría llegar a ser responsable del efecto de la sobreexpresión de FKBP51 o FKBP52 sobre la proliferación y muerte celular con los ensayos realizados. Estrategias para realizar esto podrían incluir un estudio de la expresión de genes blanco de estos factores con acción pro y anti-apoptótica, o bien el uso de estrategias de inhibición farmacológica de estos factores de transcripción.

Para estudiar de forma masiva el efecto de la sobreexpresión de FKBP51 sobre la expresión génica, se realizó el **ensayo de microarreglo** explicado en el Capítulo 3 y en la sección Materiales y Métodos. A partir de los genes con expresión diferencial entre Hek293 pCI-neo y Hek293 FKBP51 se realizaron diferentes análisis bioinformáticos que incluyeron el estudio de efectos fenotípicos asociados, vías de señalización y factores de transcripción río arriba de estos genes. El análisis realizado cuenta con la limitación de no contar hasta el momento con la validación correspondiente del ensayo por qPCR. Algunos de los genes elegidos para la validación tendrán en cuenta no solo las diferencias de expresión, sino también la importancia biológica del gen en cuestión.

Los efectos predichos río abajo de los genes con expresión diferencial entre ambos tipos celulares con el *software* IPA, incluyen funciones biológicas relacionadas con el aumento de número de células, crecimiento de tejidos, estimulación de la mitogénesis, estimulación de la invasión y formación de prolongaciones celulares, así como también, la disminución de la muerte celular. Los genes que mostraron diferencias de expresión entre las dos líneas celulares, podrían entonces llegar a explicar el efecto fenotípico

Discusión

observado sobre el incremento en el número de células y la resistencia a la muerte de células Hek293 FKBP51. En línea con estos descubrimientos, se pudo determinar que alrededor del 60% (330 de 572 genes) de los genes obtenidos por el análisis de microarreglo muestran expresión alterada en diferentes tipos de cáncer según lo determinado por la base de datos de Quiagen, *Knowledge Data Base* y el *software* IPA. Algunos de los genes de mayor relevancia biológica que participarían de estos efectos incluyen a la proteína de ciclo celular Ciclina D1, factores de crecimiento (VGF-D, IGF2), proteínas involucradas en la señalización de RhoGTPasas (RhoGDI β, CDC42, NGEF, ARH GEF37, Rac2, β8 Integrina, RINL) el receptor NOTCH3, los factores de transcripción STAT6, SOX11, la quinasa PKC, BCL3, el antígeno de células tumorales MAGE C1, la proteína quinasa de p21 PAK6, entre otros.

El estudio de reguladores río arriba con BRB tools reveló que la transcripción de los genes expresados diferencialmente en células Hek293 FKBP51 es capaz de ser regulada por diferentes factores de transcripción entre los que se encuentran E2F-4, NF- κ B, p53, ER- α , AP-1, AP-2 y c-myc. Algunos de los factores de transcripción fueron determinados con mayor fuerza estadística (significativos con más de un test estadístico). Muchos de estos factores comparten en gran medida los genes blanco que pueden regular, por lo que determinar cuáles efectivamente son regulados por FKBP51 requiere ensayos bioquímicos de otra naturaleza.

Adicionalmente, una de las vías de señalización más representadas en la lista de genes con expresión diferencial entre ambas líneas celulares corresponde a la vía de señalización Wnt/β-catenina. Tanto NF- κ B, E2F, p53, AP-1 y β-catenina participan de vías de señalización altamente interconectadas. Como se ha descripto en otras secciones, NF- κ B y los factores E2F tienen la capacidad de interactuar y regularse mutuamente (102, 103, 133). También es sabido que β-catenina puede actuar como corepresor de NF- κ B e interactuar con p65 (139). De forma análoga, E2F-1 y E2F-4 se interconectan con β-catenina (140, 141), y p53 se relaciona con las vías de señalización de todos los anteriores (94, 116, 142). Los resultados presentados en esta tesis demuestran que FKBP51 es un regulador de la actividad transcripcional de NF- κ B y posiblemente también de la familia de factores E2F. Los ensayos realizados en los capítulos anteriores proponen cierta coincidencia con la interpretación del microarreglo. En relación con la vía de AP-1, numerosos resultados de nuestro grupo de trabajo demuestran que FKBP51 es un modulador negativo de esta familia de factores de

transcripción. Con respecto a la vía de Wnt/ β -catenina, ha sido propuesto que FKBP51 interactúa con la proteína GSK3 β , la fosfatasa PP2A y Cdk5, favoreciendo la fosforilación de GSK3 β en Ser9 ,y como consecuencia, generando una mayor activación de β -catenina en neuronas (161). Los datos experimentales obtenidos con el ensayo de microarreglo muestran resultados con una interpretación similar. Once moléculas que participan de la vía de Wnt/ β -catenina muestran expresión diferencial en Hek293 FKBP51. FKBP51 no es la única FKBP que participa de esta vía de señalización; FKBP52 interactúa con β -catenina para potenciar la acción de AR (162).

De forma inédita e inesperada, un gran número de genes expresados diferencialmente entre ambas líneas celulares participan en la degradación de neurotransmisores (dopamina, serotonina, melatonina, adrenalina, etc.), están asociados a la transmisión axónica y se relacionan con enfermedades neurológicas y psiquiátricas. La expresión aumentada de los genes que participan de la degradación de neurotransmisores (MAOA, ALDH1A3, ALDH1L1, SULT1A2, SULT1A3, SULT1A4) podrían explicar el conocido rol de FKBP51 en desordenes psiquiátricos. Tal como se ha precisado en la sección Introducción, el aumento en la expresión de FKBP51 predispone a la aparición de este tipo de desórdenes. El mecanismo generalmente propuesto para la acción de FKBP51 involucra el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y al receptor nuclear GR. El hallazgo realizado en este capítulo podría ayudar a entender el rol de FKBP51 en este tipo de desórdenes. Sería importante por este motivo, validar los resultados por qPCR y luego evaluar su expresión en líneas celulares de neuronas.

En virtud de los resultados presentados, es altamente posible que la expresión aumentada de FKB51 desencadene cambios en sendas vías de señalización interconectadas entre sí, y que esto complejice su estudio. En este trabajo se ha podido mostrar que la sola sobreexpresión de FKBP51 fue suficiente para generar cambios en la proliferación y muerte celular en una línea celular no tumoral. También la sobreexpresión de FKBP51 ha logrado alterar la expresión génica en forma significativa y compatible con las observaciones fenotípicas realizadas. Los resultados generados por nuestro laboratorio y los hallazgos recopilados permiten proponer a FKBP51 como un nuevo agente y marcador pro-tumoral. Aún estamos lejos de comprender de forma acabada los mecanismos responsables de su efecto sobre la proliferación y muerte celular. Los resultados presentados en esta tesis seguramente harán una contribución en esta materia y permitirán el desarrollo de nuevas líneas de investigación. De forma análoga, los efectos observados por la sobreexpresión de FKBP52, seguramente involucren numerosos mecanismos celulares que contengan a NF- κ B y a E2F. Es posible que la inhibición de FKBP52 no sea relevante para inhibir la proliferación de células Hek293, pero que sí cobre relevancia médica en células cancerosas con una actividad incrementada de NF- κ B asociada a un aumento de la malignidad (linfomas, leucemias, cáncer de mama, entre otros mencionados en la sección Introducción).

Resulta evidente que las FKBPs han demostrado ampliamente que su función biológica trasciende a la regulación de los RE. A la luz de estos descubrimientos, pareciera importante estudiar a FKBP51 y FKBP52 teniendo en cuenta el nivel de expresión relativo entre ellas, y el contexto celular en el que se encuentran inmersas; especialmente en células tumorales donde muchas vías de señalización importantes se encuentran desreguladas.

<u>Bibliografía</u>

1. Dunyak BM, Gestwicki JE. Peptidyl-Proline Isomerases (PPIases): Targets for Natural Products and Natural Product-Inspired Compounds. J Med Chem. 2016;59(21):9622-44.

2. Hanes SD. Prolyl isomerases in gene transcription. Biochim Biophys Acta. 2015;1850(10):2017-34.

3. Fanghanel J, Fischer G. Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. Front Biosci. 2004;9:3453-78.

4. Fischer G, Bang H, Mech C. [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. Biomed Biochim Acta. 1984;43(10):1101-11.

5. Schiene-Fischer C, Aumuller T, Fischer G. Peptide bond cis/trans isomerases: a biocatalysis perspective of conformational dynamics in proteins. Top Curr Chem. 2013;328:35-67.

6. Schiene-Fischer C. Multidomain Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerases. Biochim Biophys Acta. 2015;1850(10):2005-16.

7. Lagadari M, De Leo SA, Camisay MF, Galigniana MD, Erlejman AG. Regulation of NF-kappaB signalling cascade by immunophilins. Curr Mol Pharmacol. 2016;9(2):99-108.

8. Huai Q, Kim HY, Liu Y, Zhao Y, Mondragon A, Liu JO, et al. Crystal structure of calcineurin-cyclophilincyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(19):12037-42.

9. Sun S, Guo M, Zhang JB, Ha A, Yokoyama KK, Chiu RH. Cyclophilin A (CypA) interacts with NF-kappaB subunit, p65/RelA, and contributes to NF-kappaB activation signaling. PLoS One. 2014;9(8):e96211.

10. Bukrinsky M. Extracellular cyclophilins in health and disease. Biochim Biophys Acta. 2015;1850(10):2087-95.

11. Chao SH. Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription. 2001;29(3):767-73.

12. Litchfield DW, Shilton BH, Brandl CJ, Gyenis L. Pin1: Intimate involvement with the regulatory protein kinase networks in the global phosphorylation landscape. Biochim Biophys Acta. 2015;1850(10):2077-86. 13. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, et al. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. Mol Cell. 2003;12(6):1413-26.

14. Mukai H, Kuno T, Chang CD, Lane B, Luly JR, Tanaka C. FKBP12-FK506 complex inhibits phosphatase activity of two mammalian isoforms of calcineurin irrespective of their substrates or activation mechanisms. J Biochem. 1993;113(3):292-8.

15. Xu X, Su B, Barndt RJ, Chen H, Xin H, Yan G, et al. FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell inhibition by the immunosuppressant FK506. Transplantation. 2002;73(11):1835-8.

16. Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. mTOR kinase structure, mechanism and regulation by the rapamycin-binding domain. Nature. 2013;497(7448):217-23.

17. Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, et al. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. Cell. 1995;82(3):507-22.

18. Marz AM, Fabian AK, Kozany C, Bracher A, Hausch F. Large FK506-binding proteins shape the pharmacology of rapamycin. Mol Cell Biol. 2013;33(7):1357-67.

19. Edlich F, Weiwad M, Erdmann F, Fanghanel J, Jarczowski F, Rahfeld JU, et al. Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca2+/calmodulin. Embo j. 2005;24(14):2688-99.

20. Fu YT, Zheng X, He Q, Jia XY, Guo ZX, Yao RY, et al. Silencing FKBP38 gene by siRNA induces activation of mTOR signaling in goat fetal fibroblasts. Genet Mol Res. 2015;14(3):9675-82.

21. A.M P, Schmidpeter, Koch JR, Schmid FX. Control of protein function by prolyl isomerization. Biochimica et Biophysica Acta. 2015(1850):1973–82.

22. Wu B, Li P, Liu Y, Lou Z, Ding Y, Shu C, et al. 3D structure of human FK506-binding protein 52: Implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(22):8348-53.

23. Cioffi DL, Hubler TR, Scammell JG. Organization and function of the FKBP52 and FKBP51 genes. Curr Opin Pharmacol. 2011;11(4):308-13.

24. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) NCfBI. [Web site]. 2004 [cited 2018 03/22/2018]. Available from: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/</u>.

25. The Human Protein Atlas [Available from: <u>https://www.proteinatlas.org/ENSG0000096060-</u> <u>FKBP5/tissue</u>.

26. Chun E, Lee HS, Bang BR, Kim TW, Lee SH, Kim JH, et al. Dexamethasone-induced FKBP51 expression in peripheral blood mononuclear cells could play a role in predicting the response of asthmatics to treatment with corticosteroids. J Clin Immunol. 2011;31(1):122-7.

27. Hubler TR, Denny WB, Valentine DL, Cheung-Flynn J, Smith DF, Scammell JG. The FK506-binding immunophilin FKBP51 is transcriptionally regulated by progestin and attenuates progestin responsiveness. Endocrinology. 2003;144(6):2380-7.

28. Bali U, Phillips T, Hunt H, Unitt J. FKBP5 mRNA Expression Is a Biomarker for GR Antagonism. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(11):4305-12.

29. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Putz B, et al. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. Nat Genet. 2004;36(12):1319-25.

30. Klengel T, Binder EB. FKBP5 Allele-Specific Epigenetic Modification in Gene by Environment Interaction. Neuropsychopharmacology. 2015;40(1):244-6.

31. Romano S, Staibano S, Greco A, Brunetti A, Nappo G, Ilardi G, et al. FK506 binding protein 51 positively regulates melanoma stemness and metastatic potential. Cell Death Dis. 2013;4:e578.

32. Lagadari M, Zgajnar NR, Gallo LI, Galigniana MD. Hsp90-binding immunophilin FKBP51 forms complexes with hTERT enhancing telomerase activity. Mol Oncol. 2016;10(7):1086-98.

33. Pei H, Li L, Fridley BL, Jenkins GD, Kalari KR, Lingle W, et al. FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt. Cancer Cell. 2009;16(3):259-66.

34. Erlejman AG, De Leo SA, Mazaira GI, Molinari AM, Camisay MF, Fontana V, et al. NF-kappaB transcriptional activity is modulated by FK506-binding proteins FKBP51 and FKBP52: a role for peptidyl-prolyl isomerase activity. J Biol Chem. 2014;289(38):26263-76.

35. Storer CL, Dickey CA, Galigniana MD, Rein T, Cox MB. FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease. Trends Endocrinol Metab. 2011;22(12):481-90.

36. Wochnik GM, Ruegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, Rein T. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. J Biol Chem. 2005;280(6):4609-16.

37. Barent RL, Nair SC, Carr DC, Ruan Y, Rimerman RA, Fulton J, et al. Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. Mol Endocrinol. 1998;12(3):342-54.

38. Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Cox MB, Riggs DL, Suarez-Quian C, Smith DF. Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. Mol Endocrinol. 2005;19(6):1654-66.

39. Yong W, Yang Z, Periyasamy S, Chen H, Yucel S, Li W, et al. Essential role for Co-chaperone Fkbp52 but not Fkbp51 in androgen receptor-mediated signaling and physiology. J Biol Chem. 2007;282(7):5026-36.

40. Galigniana MD, Erlejman AG, Monte M, Gomez-Sanchez C, Piwien-Pilipuk G. The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. Mol Cell Biol. 2010;30(5):1285-98.

41. Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. Essays Biochem. 2004;40:41-58.

42. Galigniana MD, Echeverria PC, Erlejman AG, Piwien-Pilipuk G. Role of molecular chaperones and TPRdomain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. Nucleus. 2010;1(4):299-308.

43. Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. Cell Signal. 2004;16(8):857-72.

44. Simons SS, Jr., Pratt WB. Glucocorticoid receptor thiols and steroid-binding activity. Methods Enzymol. 1995;251:406-22.

45. Davies TH, Ning YM, Sanchez ER. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. J Biol Chem. 2002;277(7):4597-600.

46. Silverstein AM, Galigniana MD, Kanelakis KC, Radanyi C, Renoir JM, Pratt WB. Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. J Biol Chem. 1999;274(52):36980-6.

47. Echeverria PC, Mazaira G, Erlejman A, Gomez-Sanchez C, Piwien Pilipuk G, Galigniana MD. Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta. Mol Cell Biol. 2009;29(17):4788-97.

48. Mazaira. GI, Lagadari. M, Erlejman. AG, Galigniana. MD. The Emerging Role of TPR-Domain Immunophilins in the Mechanism of Action of Steroid Receptors. Nuclear Receptor Research. 2014;Vol. 1(1):17.

49. Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. Mol Cell Biol. 2003;23(6):1922-34.

50. Elbi C, Walker DA, Romero G, Sullivan WP, Toft DO, Hager GL, et al. Molecular chaperones function as steroid receptor nuclear mobility factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(9):2876-81.

51. Assimon VA, Southworth DR, Gestwicki JE. Specific binding of tetratricopeptide repeat (TPR) proteins to heat shock protein 70 (Hsp70) and heat shock protein 90 (Hsp90) is regulated by affinity and phosphorylation. Biochemistry. 2015;54(48):7120-31.

52. Cheung-Flynn J, Roberts PJ, Riggs DL, Smith DF. C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90. J Biol Chem. 2003;278(19):17388-94.

53. Galigniana MD, Radanyi C, Renoir JM, Housley PR, Pratt WB. Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. J Biol Chem. 2001;276(18):14884-9.

54. Torigoshi T, Motokawa S, Miyashita T, Maeda Y, Koga T, Nakamura M, et al. Potentiation of glucocorticoid receptor (GR)-mediated signaling by the immunosuppressant tacrolimus in rheumatoid synoviocytes. Clin Exp Rheumatol. 2009;27(2):246-52.

55. Oda K, Nemoto H, Nagasaka Y, Kawamura A, Usui T. In vitro experimental system for evaluating inhibitory effect of investigational drugs on P-glycoprotein-mediated transcellular transport of tacrolimus (FK506). Biopharmaceutics & drug disposition. 2014;35(3):135-44.

56. Riggs DL, Cox MB, Tardif HL, Hessling M, Buchner J, Smith DF. Noncatalytic role of the FKBP52 peptidylprolyl isomerase domain in the regulation of steroid hormone signaling. Mol Cell Biol. 2007;27(24):8658-69.

57. Riggs DL, Roberts PJ, Chirillo SC, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Ratajczak T, et al. The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. The EMBO Journal. 2003;22(5):1158-67.

58. Sinars CR, Cheung-Flynn J, Rimerman RA, Scammell JG, Smith DF, Clardy J. Structure of the large FK506binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(3):868-73.

59. Quinta HR, Maschi D, Gomez-Sanchez C, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD. Subcellular rearrangement of hsp90-binding immunophilins accompanies neuronal differentiation and neurite outgrowth. J Neurochem. 2010;115(3):716-34.

60. Romano S, D'Angelillo A, Pacelli R, Staibano S, De Luna E, Bisogni R, et al. Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells. Cell Death Differ. 2010;17(1):145-57.

61. Mazaira GI, Camisay MF, De Leo S, Erlejman AG, Galigniana MD. Biological relevance of Hsp90-binding immunophilins in cancer development and treatment. Int J Cancer. 2016;138(4):797-808.

62. Balsevich G, Hausl AS, Meyer CW, Karamihalev S, Feng X, Pohlmann ML, et al. Stress-responsive FKBP51 regulates AKT2-AS160 signaling and metabolic function. Nat Commun. 2017;8(1):1725.

63. Hou J, Wang L. FKBP5 as a selection biomarker for gemcitabine and Akt inhibitors in treatment of pancreatic cancer. PLoS One. 2012;7(5):e36252.

64. Gallo LI, Ghini AA, Pilipuk GP, Galigniana MD. Differential Recruitment of Tetratricorpeptide Repeat Domain Immunophilins to the Mineralocorticoid Receptor Influences both Heat-Shock Protein 90-Dependent Retrotransport and Hormone-Dependent Transcriptional Activity. Biochemistry. 2007. 65. Gallo LI, Lagadari M, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD. The 90-kDa heat-shock protein (Hsp90)-binding immunophilin FKBP51 is a mitochondrial protein that translocates to the nucleus to protect cells against oxidative stress. J Biol Chem. 2011;286(34):30152-60.

66. Hong C, Li T, Zhang F, Wu X, Chen X, Cui X, et al. Elevated FKBP52 expression indicates a poor outcome in patients with breast cancer. Oncol Lett. 2017;14(5):5379-85.

67. Ward BK, Mark PJ, Ingram DM, Minchin RF, Ratajczak T. Expression of the estrogen receptorassociated immunophilins, cyclophilin 40 and FKBP52, in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 1999;58(3):267-80.

68. De Leon JT, Iwai A, Feau C, Garcia Y, Balsiger HA, Storer CL, et al. Targeting the regulation of androgen receptor signaling by the heat shock protein 90 cochaperone FKBP52 in prostate cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(29):11878-83.

69. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. Cancers (Basel). 2011;3(1):994-1013.

70. Galigniana MD, Harrell JM, O'Hagen HM, Ljungman M, Pratt WB. Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. J Biol Chem. 2004;279(21):22483-9.

71. Kim JH, Yu S, Chen JD, Kong ANT. The nuclear cofactor RAC3/AIB1/SRC-3 enhances Nrf2 signaling by interacting with transactivation domains. Oncogene. 2013;32(4):514-27.

72. Li H, Gomes PJ, Chen JD. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(16):8479-84.

73. Werbajh S, Nojek I, Lanz R, Costas MA. RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. FEBS Lett. 2000;485(2-3):195-9.

74. Fauquier L, Duboe C, Jore C, Trouche D, Vandel L. Dual role of the arginine methyltransferase CARM1 in the regulation of c-Fos target genes. Faseb j. 2008;22(9):3337-47.

75. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS, Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol. 1995;15(2):943-53.

76. Mikenberg I, Widera D, Kaus A, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. Transcription factor NF-kappaB is transported to the nucleus via cytoplasmic dynein/dynactin motor complex in hippocampal neurons. PLoS One. 2007;2(7):e589.

77. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(4).

78. Basseres DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. Oncogene. 2006;25(51):6817-30.

79. Muller CW, Harrison SC. The structure of the NF-kappa B p50:DNA-complex: a starting point for analyzing the Rel family. FEBS Lett. 1995;369(1):113-7.

80. Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling. Cell Res. 2011;21(1):86-102.

81. Sun SC. Non-canonical NF-κB signaling pathway. Cell Res. 2011;21(1):71-85.

82. Li S, Wang L, Dorf ME. PKC phosphorylation of TRAF2 mediates $IKK\alpha/\beta$ recruitment and K63-linked polyubiquitination. Mol Cell. 2009;33(1):30-42.

83. Holden NS, Squires PE, Kaur M, Bland R, Jones CE, Newton R. Phorbol ester-stimulated NF-kappaBdependent transcription: roles for isoforms of novel protein kinase C. Cell Signal. 2008;20(7):1338-48.

84. Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF-κB Subunits by Phosphorylation. Cells. 2016;5(1).

85. Collins PE, Mitxitorena I, Carmody RJ. The Ubiquitination of NF-κB Subunits in the Control of Transcription. Cells. 2016;5(2).

86. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. Mol Cancer. 2013;12:86.

87. Xu H, You M, Shi H, Hou Y. Ubiquitin-mediated NFκB degradation pathway. Cell Mol Immunol. 2015;12(6):653-5.

88. Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, et al. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. J Cell Sci. 1997;110 (Pt 3):369-78.

89. Pasqualucci L, Zhang B. Genetic drivers of NF-kappaB deregulation in diffuse large B-cell lymphoma. Seminars in cancer biology. 2016;39:26-31.

90. Park MH, Hong JT. Roles of NF-κB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. Cells. 2016;5(2).

91. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. Aaps j. 2013;15(1):195-218.

92. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, et al. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. Blood. 2002;100(5):1828-34.

93. Sors A, Jean-Louis F, Begue E, Parmentier L, Dubertret L, Dreano M, et al. Inhibition of IkappaB kinase subunit 2 in cutaneous T-cell lymphoma down-regulates nuclear factor-kappaB constitutive activation, induces cell death, and potentiates the apoptotic response to antineoplastic chemotherapeutic agents. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(3):901-11.

94. Hsieh JK, Fredersdorf S, Kouzarides T, Martin K, Lu X. E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. Genes Dev. 1997;11(14):1840-52.

95. Blais A, Dynlacht BD. Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. Curr Opin Genet Dev. 2004;14(5):527-32.

96. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. Oncogene. 2005;24(17):2810-26.

97. Ait-Si-Ali S, Polesskaya A, Filleur S, Ferreira R, Duquet A, Robin P, et al. CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. Oncogene. 2000;19(20):2430-7.

98. Cam H, Dynlacht BD. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. Cancer Cell. 2003;3(4):311-6.

99. Iaquinta PJ, Lees JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. Curr Opin Cell Biol. 2007;19(6):649-57.

100. Lindeman GJ, Gaubatz S, Livingston DM, Ginsberg D. The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(10):5095-100.

101. Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K. E2F target genes: unraveling the biology. Trends Biochem Sci. 2004;29(8):409-17.

102. Araki K, Kawauchi K, Tanaka N. IKK/NF-kappaB signaling pathway inhibits cell-cycle progression by a novel Rb-independent suppression system for E2F transcription factors. Oncogene. 2008;27(43):5696-705.

103. Ankers JM, Awais R, Jones NA, Boyd J, Ryan S, Adamson AD, et al. Dynamic NF-kappaB and E2F interactions control the priority and timing of inflammatory signalling and cell proliferation. Elife. 2016;5.
104. Hetru C, Hoffmann JA. NF-kappaB in the immune response of Drosophila. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2009;1(6):a000232.

105. Romano S, Xiao Y, Nakaya M, D'Angelillo A, Chang M, Jin J, et al. FKBP51 employs both scaffold and isomerase functions to promote NF-kappaB activation in melanoma. Nucleic Acids Res. 2015;43(14):6983-93.

106. Chen G, Cao P, Goeddel DV. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. Mol Cell. 2002;9(2):401-10.

107. Hinz M, Broemer M, Arslan SC, Otto A, Mueller EC, Dettmer R, et al. Signal responsiveness of IkappaB kinases is determined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90. J Biol Chem. 2007;282(44):32311-9.

108. Erlejman AG, Lagadari M, Harris DC, Cox MB, Galigniana MD. Molecular chaperone activity and biological regulatory actions of the TPR-domain immunophilins FKBP51 and FKBP52. Curr Protein Pept Sci. 2014;15(3):205-15.

109. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-kappaB, an active player in human cancers. Cancer Immunol Res. 2014;2(9):823-30.

110. Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M. Constitutive and interleukin-1inducible phosphorylation of p65 NF-kappaB at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including IkappaB kinase (IKK)-alpha, IKKbeta, IKKepsilon, TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31mediated interleukin-8 transcription. J Biol Chem. 2004;279(53):55633-43.

111. Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P, Longo DL. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I{kappa}B{alpha}-independent NF-{kappa}B pathway. J Biol Chem. 2005;280(41):34538-47.

112. Buss H, Handschick K, Jurrmann N, Pekkonen P, Beuerlein K, Müller H, et al. Cyclin-Dependent Kinase 6 Phosphorylates NF-κB P65 at Serine 536 and Contributes to the Regulation of Inflammatory Gene Expression. PLoS One. 2012;7(12).

113. Huang B, Yang XD, Lamb A, Chen LF. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. Cell Signal. 2010;22(9):1282-90.

114. Miyata Y, Chambraud B, Radanyi C, Leclerc J, Lebeau MC, Renoir JM, et al. Phosphorylation of the immunosuppressant FK506-binding protein FKBP52 by casein kinase II: regulation of HSP90-binding activity of FKBP52. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(26):14500-5.

115. Harrell JM, Kurek I, Breiman A, Radanyi C, Renoir JM, Pratt WB, et al. All of the protein interactions that link steroid receptor.hsp90.immunophilin heterocomplexes to cytoplasmic dynein are common to plant and animal cells. Biochemistry. 2002;41(17):5581-7.

116. Gu L, Findley HW, Zhou M. MDM2 induces NF-kappaB/p65 expression transcriptionally through Sp1-binding sites: a novel, p53-independent role of MDM2 in doxorubicin resistance in acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002;99(9):3367-75.

117. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature. 2012;489(7414):57-74.

118. Tang J, Zhan MN, Yin QQ, Zhou CX, Wang CL, Wo LL, et al. Impaired p65 degradation by decreased chaperone-mediated autophagy activity facilitates epithelial-to-mesenchymal transition. Oncogenesis. 2017;6(10):e387.

119. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. Trends Cell Biol. 1998;8(10):397-403.

120. Laiseca JE, Ladelfa MF, Cotignola J, Peche LY, Pascucci FA, Castano BA, et al. Functional interaction between co-expressed MAGE-A proteins. PLoS One. 2017;12(5):e0178370.

121. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. FEBS Lett. 1998;435(1):29-34.

122. Grimm T, Schneider S, Naschberger E, Huber J, Guenzi E, Kieser A, et al. EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. Blood. 2005;105(8):3263-9.

123. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. Int J Cancer. 1977;19(5):621-6.

124. Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. Cardiovasc Res. 2001;50(3):556-65.

125. Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. Crit Rev Oncol Hematol. 2004;50(2):87-100.

126. Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Samaniego R, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. Blood. 2006;108(9):3143-51.

127. Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, Van den Steen PE, Hernandez del Cerro M, Roderfeld M, et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. Cancer Cell. 2010;17(2):160-72.

128. Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, et al. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. Blood. 1999;94(6):2080-9.

129. Bracher A, Kozany C, Thost A-K, Hausch F. Structural characterization of the PPIase domain of FKBP51, a cochaperone of human Hsp90. Acta Crystallographica Section D. 2011;67(6):549-59.

130. Park BS, Abdel-Azeem AZ, Al-Sanea MM, Yoo KH, Tae JS, Lee SH. Staurosporine analogues from microbial and synthetic sources and their biological activities. Curr Med Chem. 2013;20(31):3872-902.

131. Garcia JS, Percival ME. Midostaurin for the treatment of adult patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia that is FLT3 mutation-positive. Drugs Today (Barc). 2017;53(10):531-43.

132. . !!! INVALID CITATION !!! {}.

133. Palomer X, Alvarez-Guardia D, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Vazquez-Carrera M. The interplay between NF-kappaB and E2F1 coordinately regulates inflammation and metabolism in human cardiac cells. PloS one. 2011;6(5):e19724.

134. Persengiev SP, Kondova, II, Kilpatrick DL. E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. Mol Cell Biol. 1999;19(9):6048-56.

135. Enos ME, Bancos SA, Bushnell T, Crispe IN. E2F4 modulates differentiation and gene expression in hematopoietic progenitor cells during commitment to the lymphoid lineage. J Immunol. 2008;180(6):3699-707.

136. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2002;16(8):869-71.

137. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. Nat Commun. 2014;5:4767.

138. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. Oncogene. 2017;36(11):1461-73.

139. Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/beta-Catenin and NF-kappaB Signaling Pathway during Inflammation. Frontiers in immunology. 2016;7:378.

140. Hughes TA, Brady HJ. Cross-talk between pRb/E2F and Wnt/beta-catenin pathways: E2F1 induces axin2 leading to repression of Wnt signalling and to increased cell death. Experimental cell research. 2005;303(1):32-46.

141. Morris EJ, Ji JY, Yang F, Di Stefano L, Herr A, Moon NS, et al. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. Nature. 2008;455(7212):552-6.

142. Sadot E, Geiger B, Oren M, Ben-Ze'ev A. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. Molecular and cellular biology. 2001;21(20):6768-81.

143. Tatro ET, Everall IP, Kaul M, Achim CL. Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder. Brain research. 2009;1286:1-12.

144. Morishima Y, Wang AM, Yu Z, Pratt WB, Osawa Y, Lieberman AP. CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. Human molecular genetics. 2008;17(24):3942-52.

145. Jiang B, Shen H, Chen Z, Yin L, Zan L, Rui L. Carboxyl Terminus of HSC70-interacting Protein (CHIP) Down-regulates NF-κB-inducing Kinase (NIK) and Suppresses NIK-induced Liver Injury. The Journal of biological chemistry. 2015;290(18):11704-14.

146. Wang L, Kang F, Li J, Zhang J, Shan B. Overexpression of p65 attenuates celecoxib-induced cell death in MDA-MB-231 human breast cancer cell line2013. 14 p.

147. Schmidpeter PA, Jahreis G, Geitner AJ, Schmid FX. Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline. Biochemistry. 2011;50(21):4796-803.

148. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of highquality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular Systems Biology. 2011;7:539.
149. Erlejman AG, Lagadari M, Toneatto J, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD. Regulatory role of the 90kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. Biochimica et biophysica acta. 2014;1839(2):71-87.

150. Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheidereit C. Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. Leukemia. 2000;14(3):399-402.

151. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood cancer journal. 2017;7(6):e577.

152. Niewerth D, Dingjan I, Cloos J, Jansen G, Kaspers G. Proteasome inhibitors in acute leukemia. Expert review of anticancer therapy. 2013;13(3):327-37.

153. Sulaiman OA, Voda J, Gold BG, Gordon T. FK506 increases peripheral nerve regeneration after chronic axotomy but not after chronic schwann cell denervation. Experimental neurology. 2002;175(1):127-37.

154. Briani C, Visentin A, Salvalaggio A, Imbergamo S, Piazza F, Cacciavillani M, et al. Peripheral neuropathies in chronic lymphocytic leukemia: a single center experience on 816 patients. Haematologica. 2017;102(4):e140-3.

155. Broemer M, Krappmann D, Scheidereit C. Requirement of Hsp90 activity for IkappaB kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF-kappaB activation. Oncogene. 2004;23(31):5378-86.

156. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. The pro- or antiapoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. European journal of biochemistry. 2000;267(12):3828-35.

157. Fan Y, Dutta J, Gupta N, Fan G, Gelinas C. Regulation of programmed cell death by NF-kappaB and its role in tumorigenesis and therapy. Advances in experimental medicine and biology. 2008;615:223-50.

158. Radhakrishnan SK, Kamalakaran S. Pro-apoptotic role of NF-kappaB: implications for cancer therapy. Biochimica et biophysica acta. 2006;1766(1):53-62.

159. Fernandez Larrosa PN, Ruiz Grecco M, Mengual Gomez D, Alvarado CV, Panelo LC, Rubio MF, et al. RAC3 more than a nuclear receptor coactivator: a key inhibitor of senescence that is downregulated in aging. Cell Death Dis. 2015;6:e1902.

160. Panelo LC, Machado MS, Rubio MF, Jaworski F, Alvarado CV, Paz LA, et al. High RAC3 expression levels are required for induction and maintaining of cancer cell stemness. Oncotarget. 2018;9(5):5848-60. 161. Gassen NC, Hartmann J, Zannas AS, Kretzschmar A, Zschocke J, Maccarrone G, et al. FKBP51 inhibits GSK3beta and augments the effects of distinct psychotropic medications. Molecular psychiatry. 2016;21(2):277-89.

162. Storer Samaniego C, Suh JH, Chattopadhyay A, Olivares K, Guy N, Sivils JC, et al. The FKBP52 Cochaperone Acts in Synergy with beta-Catenin to Potentiate Androgen Receptor Signaling. PloS one. 2015;10(7):e0134015.