



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación Biomédica

**El Receptor de Quimioquinas CCR7
Induce Ubiquitinación de Proteínas en
el Núcleo de las Células Dendríticas**

Carolina Gómez Moreira

Madrid 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación Biomédica



El Receptor de Quimioquinas CCR7 Induce Ubiquitinación de Proteínas en el Núcleo de las Células Dendríticas

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Carolina Gómez Moreira

Director:

José Luis Rodríguez Fernández

Madrid 2018

El Dr. José Luis Rodríguez Fernández, Investigador Científico del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB – CSIC) de Madrid.

CERTIFICA

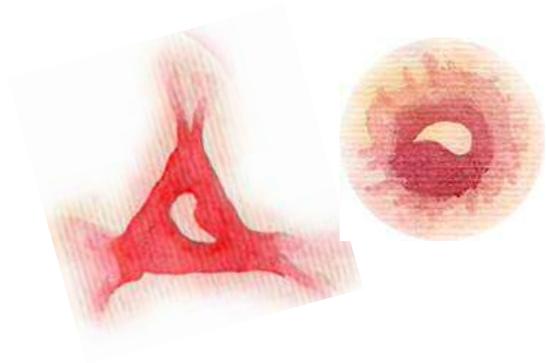
Que el trabajo titulado: “El Receptor de Quimioquinas CCR7 Induce Ubiquitinación de Proteínas en el Núcleo de las Células Dendríticas”, que presenta Carolina Gómez Moreira para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo mi dirección en el grupo de “Funciones de los receptores quimiotácticos y la sinapsis inmunológica en las células dendríticas” del CIB y reúne la calidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid, 20 de marzo de 2018.



Dr. José Luis Rodríguez Fernández

“Research is not a systematic occupation
but an intuitive artistic vocation”



Albert Szent-Gyorgyi

A mi familia, y a tí, Paolo

AGRADECIMIENTOS

Si tuviera que hablar de toda la gente maravillosa con la que me he topado estos años, creo que ocuparía más que toda esta tesis. Sin poderles dedicar todo el espacio que se merecen, me gustaría dedicarles unas palabras.

José Luis, gracias por darme la oportunidad de formarme como investigadora en tu laboratorio, por tu respeto y por tu confianza. Siempre has hecho valer mi opinión tanto como la tuya, aun cuando mis conocimientos son muchísimo menores que los tuyos. Gracias por enseñarme lo bonito que es este trabajo y por contagiarme la pasión tan grande que tienes por la ciencia.

A mis compañeras de bata y de cultivos, creo que me hubiera vuelto loca si no os hubiera tenido a mi lado. Gracias por acogerme con tanto cariño. Me habéis levantado y animado a seguir, tantas veces, que no sé dónde estaría si no fuera por vuestro apoyo. Todas me habéis enseñado algo diferente, y no hablo solo de ciencia, sino de la vida. Esta tesis tiene un cachito de cada una de vosotras y espero que sigáis formando parte de mi vida siempre.

Gracias a los servicios técnicos del CIB, sin los cuales el desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias al laboratorio de inmunooncología del Hospital Gregorio Marañón, por ayudarme a hacer frente a la tormenta, me llevo a gente maravillosa de allí.

También me gustaría agradecer al departamento de fisiología de la facultad de medicina. Gracias Soni, por ayudarme a dar mis primeros pasitos en la investigación. Ana, gracias por enseñarme todo lo que sabías. Anabel y M^a Ángeles, fuisteis como dos madres cuyo apoyo fue fundamental para mí en muchos momentos. Y a todo el departamento, un enorme GRACIAS.

Me siento una persona muy afortunada por la familia que tengo. Si algún día llego lejos, será porque he partido con ventaja. Me habéis apoyado en cada una de mis decisiones, sin importar lo descabelladas que fueran. Fer, Susa, sois las personas más luchadoras que conozco, sabéis buscarle caminos alternativos a cada problema que os plantea la vida y os admiro tanto, que ojalá pueda llegar a ser como vosotros algún día. Gracias Martín, Yeya y Yaya.

Y a tí, Paolo, me completas y me haces feliz. Gracias

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACR	Atypical chemokine receptor
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín-difosfato
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
AKT	Protein kinase B
AMP	Adenosín-monofosfato
APC	Anaphase promoting complex
ATP	Adenosin-trifosfato
BSA	Bovine serum albumin
BTB	Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac domain
CAND1	Cullin-associated and neddylation-dissociated 1
CCD	Charge-coupled device camera
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor
CD14	Cluster of differentiation 14
CDs	Células dendríticas
CLSM	Microscopio Láser Confocal espectral
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CRL	Cullin-containing RING-E3 ligase
CSN	Señalosome COP9
Cul-1	Cullin-1
CXCL	Chemokine (CXC motif) ligand
CXCR	Chemokine (CXC motif) receptor
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCAF	DDB1- and CUL4-associated factor
DCN1	Defective in cullin neddylation protein 1
DCUN1D1	DCN1-like protein 1
DDB1	DNA damage-binding protein 1
DEN1	Deneddylase 1
DRY	Aspártico, arginina, tirosina
DTT	Ditiotreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EGTA	Ácido etilenbis(oxietilennitrilo)tetracético
ELC	Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (verde)
FL1	Fluorescence laser 1
FOXO	Forkhead box protein O
GAG	Glicosaminoglicano
GDP	Guanosín difosfato

GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP	Guanosín monofosfato
GPCRs	Receptor acoplado a proteína G
GRK	G-receptor coupled kinase
GTP	Guanosín trifosfato
G α i	Subunidad α i de la proteína G
G α 13	Subunidad α 13 de la proteína G
G β 2	Subunidad β 2 de la proteína G
HCD	Colisión de alta energía
HECT	Homologous to E6-AP carboxyterminus
Hepes	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Inmunoglobulina G
IL-4	Interleukina 4
I κ B α	Inhibitor of Nf κ B protein α
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K	Lisina
KO	Knock out
LAT	Linker for activation of T cells
LC	Cromatografía líquida
LDH	Lactato deshidrogenasa
LIMK	LIM domain kinase
M	Metionina
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MHC	Major histocompatibility complex
MLC	Myosin Light Chain
MS	Espectrometría de masas
Mst1	Mammalian Sterile 20-like 1 Kinase
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex
MYPT1	Myosin phosphatase target subunit 1
NAE	Nedd-activating enzyme 1
Nedd8	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Célula natural killer
NP-40	Nonidet p-40
p65	Transcription factor p65 (NF κ B)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehido
PHD	Plant homeo domain
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protein kinase A

PKC	Protein kinase C
PLA	Proximity Ligation Assay
ppm	Partes por millón
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
PYK2	Protein Tyrosine Kinase 2 Beta
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Kinase
Rbl2	Retinoblastoma-like protein 2
Rbx1	RING-box protein 1
Rbx2	RING-box protein 2
Rho A	Ras homolog gene family, member A
RING	Really interesting new gene
ROCK	Rho-associated protein kinase
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SCF	Skp1-Cul1-Fbox complex
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida con SDS
siRNA	Small interfering RNA
SI	Sistema inmunológico
Skp1	S-Phase kinase associated protein 1
Skp2	S-Phase kinase associated protein 2
SLC	Secondary lymphoid-tissue chemokine
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tween Tris-buffered saline
TCR	T Cell receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α
Tris-HCl	Tris ácido clorhídrico
TRITC	Tetrametilrodamina
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
UBA1	Ubiquitin activating enzyme 1
Ub	Ubiquitina
UBA1	Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L3
UCHL3	Ubiquitin activating enzyme 1
ULM	Ubiquitin like modifier proteins
UPS	Ubiquitin proteasome system
Zn	Zinc
4EBP1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	11
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	13
RESUMEN	21
SUMMARY	25
RESUMEN GRÁFICO	29
INTRODUCCIÓN	31
1. El sistema inmunológico	31
2. Ciclo biológico y función de las células dendríticas	32
3. Las quimioquinas y sus receptores	35
3.1 Las quimioquinas	35
3.2 Los receptores de quimioquinas	37
4. Las quimioquinas CCL19 y CCL21 y su receptor CCR7	40
4.1 CCL19 y CCL21	40
4.2 CCR7	42
5. Funciones reguladas por CCR7 en las CD _s y vías de señalización intracelulares.	44
5.1 CCR7 y la regulación de la quimiotaxis	45
5.2 CCR7 y la regulación de la supervivencia de las CD _s	46
5.3 CCR7 y la regulación del citoesqueleto de actina	47
6. El sistema ubiquitina-proteasoma	48
6.1 La ubiquitinación	50
6.2 Las ligasas E3 de ubiquitina	56
6.3 El complejo SCF (CRL-1)	59
6.4 Regulación de la actividad de SCF	61
6.5 Principales dianas conocidas del complejo SCF	68
6.6 El proteasoma 26 _s	69
6.7 El sistema UPS en patología	72
ANTECEDENTES	75
HIPÓTESIS	77
OBJETIVOS	77
MATERIALES Y MÉTODOS	79
Reactivos generales	79
Modelo experimental	80

Experimentos de estimulación de CCR7	81
Experimentos con inhibidores.....	82
Western Blot	82
Inmunofluorescencias.....	84
Ensayo de ligación por proximidad: PLA (Proximity Ligation Assay)	85
Fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares	86
Inmunoprecipitaciones.....	87
Inmunoprecipitación nuclear	88
Análisis proteómico	89
Digestión con tripsina	89
Análisis LC-MS	89
Nucleofecciones.....	91
Ensayos de quimiotaxis	92
Ensayos de endocitosis.....	93
Análisis de la apoptosis	93
Análisis de la citoarquitectura	94
Análisis estadístico.....	95
RESULTADOS	97
1. La estimulación de CCR7 en las células dendríticas induce nedilación de Cullin-1 mediada por Gai.	97
2. Las funciones reguladas por CCR7 en las CDs no dependen de la nedilación	99
2.1 La inhibición de la nedilación no afecta a la supervivencia inducida por CCR7	99
2.2 La nedilación no regula la quimiotaxis inducida por CCR7	104
2.3 La nedilación no controla la velocidad migratoria inducida por CCR7.....	106
2.4 La nedilación no regula la endocitosis dependiente de CCR7.....	108
2.5 La nedilación no está implicada en los cambios de morfología celular producidos por CCR7	109
3. Nedd8 se concentra en el núcleo de las células dendríticas	111
4. Cul-1 ^{Nedd8} forma parte de un complejo SCF en el núcleo.	112
5. CCR7 induce nedilación/activación de SCF que estimula la ubiquitinación de proteínas en el núcleo de las CDs.	115
5.1 CCR7 estimula la poliubiquitinación de tipo K48 en el núcleo de las CDs a través de la nedilación.....	115
5.2 La nedilación específica de Cul-1 regula la ubiquitinación inducida por CCR7 en CDs.	120

6.El proteasoma se localiza próximo a SCF en el núcleo de las CDs.....	122
7.Posibles proteínas candidatas a ser ubiquitinadas bajo la estimulación de CCR7: Análisis del interactoma de Cul-1 en el núcleo de las CDs.....	124
DISCUSIÓN	127
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXO	155

RESUMEN

Las células dendríticas (CDs) son células presentadoras de antígenos que desempeñan un papel crucial en el comienzo de la respuesta inmunológica adaptativa. En los tejidos y antes de su encuentro con el antígeno, las CDs se encuentran en un estado inmaduro, sin embargo, cuando las CDs inmaduras se exponen a patógenos u otras “señales de peligro”, sufren un proceso denominado maduración o activación durante el cual, entre otros cambios, se produce el incremento en la expresión del receptor de quimioquinas CCR7. Este receptor controla la migración de las CDs maduras desde el foco de inflamación hacia los ganglios linfáticos, siguiendo un gradiente de concentración de los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21. En los ganglios, las CDs presentarán los antígenos endocitados a los linfocitos T específicos para generar una respuesta adaptativa. Además de la quimiotaxis, CCR7 regula otras funciones en las CDs, como la maduración, la supervivencia, la endocitosis, la citoarquitectura y la velocidad migratoria.

El complejo SCF es un complejo enzimático con actividad E3 ubiquitin ligasa encargado de la ubiquitinación de numerosas proteínas en la célula para posteriormente ser degradadas por el proteasoma. Este complejo está compuesto por Skp1, Rbx1 y Cul-1. Para que el complejo se active, es necesario que la proteína de ensamblaje Cul-1 sea modificada covalentemente por Nedd8, una molécula homóloga a la ubiquitina, mediante un proceso denominado nedilación.

En este trabajo estudiamos si CCR7 podía estar induciendo nedilación, y consecuente activación, de la ubiquitin ligasa SCF en las CDs y también investigamos las consecuencias funcionales de dicha activación. En primer lugar, observamos que la estimulación de CCR7 con CCL21 inducía nedilación de Cul-1 a través de la señalización mediada por la familia de proteínas de Gai. Posteriormente analizamos si dicha nedilación podía estar mediando alguna de las funciones reguladas por CCR7 en las células dendríticas. Sin embargo, observamos que la inhibición farmacológica de la nedilación con MLN4924 (MLN) no afectaba a las funciones reguladas por CCR7, incluyendo, la supervivencia, quimiotaxis, velocidad migratoria, endocitosis o la citoarquitectura de estas células.

Sorprendentemente, observamos que la nedilación de Cul-1 ocurría en el núcleo de las CDs. En este sentido, se comprobó que Cul-1 se encontraba en el núcleo formando parte del complejo SCF con Skp1 y Rbx1. En este trabajo también observamos que la estimulación de CCR7 indujo poliubiquitinación tipo K48 (Poli-Ub-K48), relacionada con la degradación proteasomal, en el núcleo de las CDs. Dicho incremento en Poli-Ub-K48 se inhibió cuando las células fueron pretratadas con MLN. La reducción en los niveles de Cul-1 mediante un siRNA tuvo un efecto similar sobre la Poli-Ub-K48 inducida por CCR7.

Estos resultados sugieren que CCR7 induce la Poli-Ub-K48 de proteínas a través de la nedilación de Cul-1, lo cual induce activación de la E3 ligasa SCF en el núcleo de las CDs. Apoyando este concepto, nuestros estudios indican que la ubiquitina (Ub) colocaliza con Nedd8 en el núcleo de las CDs y además la Ub

nuclear desaparece cuando se inhibe la nedilación con MLN o cuando se silencia Cul-1 mediante un siRNA.

Finalmente, analizamos si la degradación de las proteínas ubiquitinadas podía estar ocurriendo en el mismo núcleo de las CDs. Nuestros estudios mostraron la presencia de un componente del proteasoma 26S en el núcleo de las CDs y su posible cercanía con el complejo SCF, sugiriendo que la degradación de las proteínas ubiquitinadas en respuesta a CCR7 podría darse en el núcleo de las CDs. Con el fin de averiguar qué proteínas se ubiquitinan en respuesta a la estimulación de CCR7, se realizaron estudios de proteómica precipitando Cul-1 de extractos de proteínas nucleares. El análisis del interactoma de Cul-1 sugiere que esta proteína puede estar participando en el metabolismo de proteínas, y, posiblemente, en el mantenimiento de la proteostasis nuclear.

En conclusión, nuestros resultados indican que CCR7 puede inducir otros tipos de modificaciones post-traduccionales diferentes a la fosforilación, como es la nedilación y la ubiquitinación. Este trabajo describe una nueva vía de señalización regulada por CCR7 que induce la nedilación de Cul-1 y la activación de SCF en el núcleo de las CDs. Este complejo es responsable de la Poli-Ub-K48 de proteínas nucleares. La presencia de proteasomas y su cercanía a SCF sugieren que la degradación de proteínas puede darse en el núcleo de las CDs. En este sentido, los datos obtenidos permiten especular que CCR7 podría estar participando en el mantenimiento de la proteostasis nuclear.

SUMMARY

Dendritic cells (DCs) are potent antigen presenting cells, key for the development of an adaptive immune response. DCs are found in peripheral tissues in an immature state, but when these cells encounter a pathogen or a “danger signal”, they undergo a process called maturation, in which, they upregulate the expression of chemokine receptor CCR7. This receptor controls the migration of DCs from the inflammation site to the lymph nodes, following the concentration gradient of its ligands, chemokines CCL19 and CCL21. In the lymph nodes, DCs will present the antigens endocytosed to specific T cells to activate an adaptive response. In addition to chemotaxis, CCR7 controls other functions in DCs, such as maturation, survival, endocytosis, cytoarchitecture and migratory speed.

The SCF complex (Skp1-Cul-1-Fbox containing complex) is an E3 ubiquitin ligase enzyme that mediates the ubiquitination of a large number of proteins in the cell to induce their degradation by the ubiquitin proteasome system. This complex contains the proteins Skp1, Rbx1 and Cul-1. For SCF to be activated, Cul-1 has to be modified covalently by Nedd8, an ubiquitin-like protein. This process is called neddylation.

In this study we wanted to find out if CCR7 could induce neddylation of the SCF and the functional significance of this process in DCs. First, we observed that stimulation of CCR7 with CCL21 induces neddylation of Cul-1 through Gai protein signaling. Next, we analyzed if this neddylation could be controlling CCR7-regulated functions in DCs. In this regard, we inhibited neddylation with a

drug called MLN4924 (MLN), but we observed no effect of this inhibition in CCR7 induced survival, chemotaxis, migratory speed, endocytosis or cytoarchitecture changes in DCs.

We later found that neddylation of Cul-1 was occurring in the nucleus of DCs and we confirmed that Cul-1 was part of the SCF complex, along with Skp1 and Rbx1 in the nucleus.

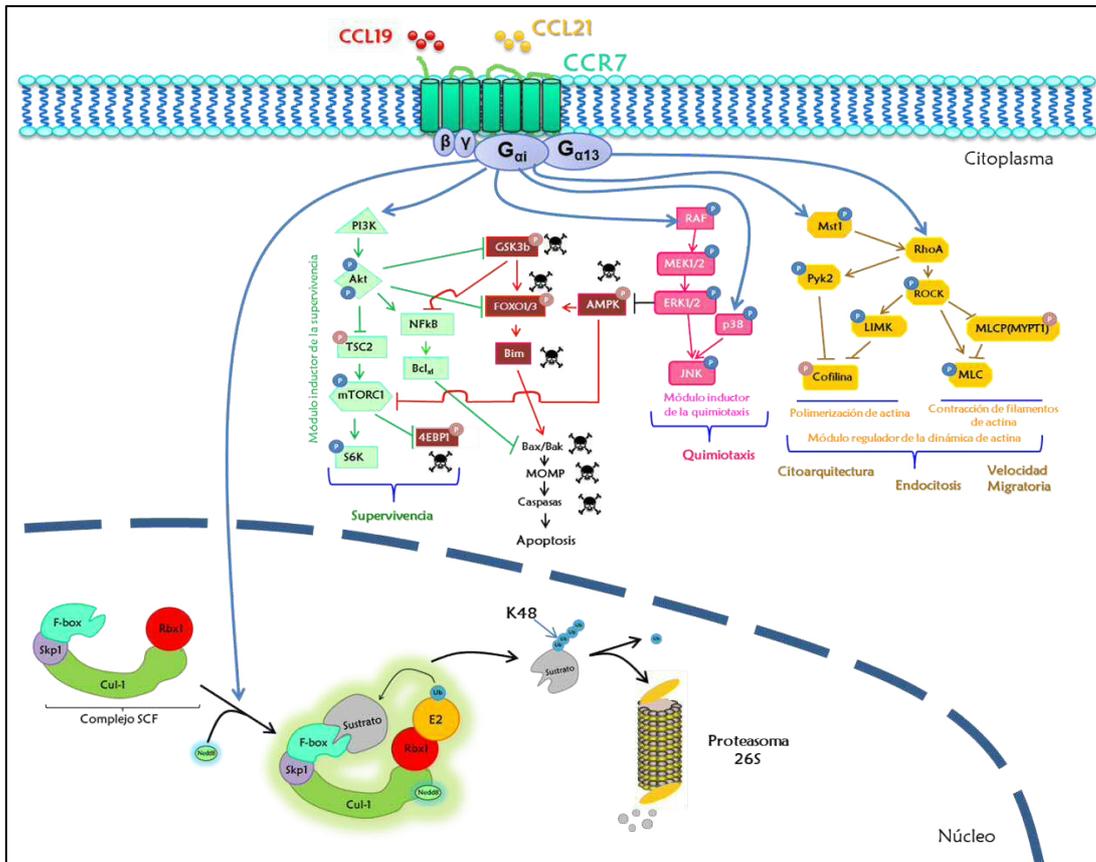
Upon CCR7 stimulation, we observed an increase in K48 polyubiquitination (K48-Poly-Ub), known to direct proteins for their degradation by the proteasome, in the nucleus of DCs. This increase was prevented by MLN treatment. A similar result was observed when Cul-1 levels were reduced with a siRNA. These results indicate that CCR7 is inducing K48-Poly-Ub of proteins in the nucleus of DCs through SCF Neddylation/activation. Consistent with these results, fluorescence microscopy analysis showed Ub was found concentrated in the nucleus of DCs co-localizing with Nedd8. Upon MLN treatment or Cul-1 reduction by a siRNA, Ub levels decreased in the nucleus of DCs. We could also detect proximity between Nedd8 and Ub, abolished when DCs were treated with MLN.

Likewise, we wondered whether degradation also could be taking place in the nucleus of DCs. Our studies show there are proteasomes in the nucleus of DCs and these superstructures seem to be close to the SCF complex, suggesting degradation of ubiquitinated proteins in response to SCF could also take place in the nucleus of DCs.

To find out which proteins are being ubiquitinated in response to CCR7, we carried out proteomic studies of the nuclear interactome of Cul-1. Our results indicate Cul-1 could participate in proteins metabolism, and, possibly, in the maintenance of nuclear proteostasis.

In conclusion, we have observed that CCR7 can induce other types of posttranslational modifications, different from phosphorylation, such as neddylation and ubiquitination. We describe a new signaling pathway in which CCR7 induces neddylation of Cul-1 and the activation of the SCF complex. This takes place largely in the nucleus of DCs and it is responsible for the K48-Poly-Ub of proteins in this compartment. Degradation also could be taking place in the nucleus of DCs, as the presence of proteasomes seems to indicate. In this regard, we speculate CCR7 could be participating in the maintenance of nuclear proteostasis.

RESUMEN GRÁFICO



Modelo actualizado de la señalización intracelular activada por CCR7. La estimulación de CCR7 con sus ligandos, CCL19 y CCL21, induce un aumento de la supervivencia, la quimiotaxis, la velocidad migratoria y la endocitosis, así como cambios en la citoarquitectura de las CD. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren una nueva vía de señalización en la que la estimulación de CCR7 induce la nedilación de Cul-1 en el núcleo, activando así al complejo SCF, que induce poliubiquitinación tipo K48 de proteínas nucleares, para ser degradadas posteriormente por el proteasoma.

INTRODUCCIÓN

1. El sistema inmunológico

El sistema inmunológico (SI) protege al organismo frente a múltiples amenazas, incluyendo patógenos, agentes físicos y químicos o células tumorales, gracias a la coordinación de dos tipos de respuestas inmunológicas: la respuesta innata y la respuesta adaptativa. La respuesta inmunológica innata constituye la primera línea de defensa del organismo y es la encargada de reconocer las amenazas y actuar de manera inmediata y, relativamente, inespecífica para eliminarlas (Dudek, Martin et al. 2013). Las células del sistema inmune innato y otras células del organismo expresan receptores que reconocen estructuras microbianas conservadas denominadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (“pathogen associated molecular patterns (PAMPs), u otras “señales de peligro”, “patrones moleculares asociados al daño” (“damage associated molecular patterns (DAMPs))(Medzhitov 2001), que activan una respuesta inflamatoria en estas células.

La respuesta inmunológica adaptativa se desencadena de manera muy específica contra agentes que son reconocidos como antígenos. Comparada con la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa se produce de manera más tardía (tras varios días). Está mediada principalmente por los linfocitos T y los linfocitos B, que tras ser activados por células de la inmunidad innata, maduran y generan clones de linfocitos específicos contra el antígeno (Iwasaki and Medzhitov 2015). Estos clones serán los responsables de generar la llamada “memoria

inmunológica”, que consiste en la capacidad del sistema inmune de reaccionar de manera rápida y específica si se expone nuevamente a un antígeno con el que ya haya estado en contacto previamente (Dudek, Martin et al. 2013).

Aunque hasta ahora se pensaba que la memoria inmunológica era exclusiva del SI adaptativo, recientemente se ha descubierto que el SI innato posee una capacidad similar, a la que se ha denominado “inmunidad entrenada” (“trained immunity”). Este tipo de “memoria” confiere a las células del SI innato la capacidad de responder de manera más rápida y eficiente frente a un determinado antígeno con el que ya han estado en contacto anteriormente (Franceschi, Salvioli et al. 2017; Lee, Geng et al. 2017).

Para que se inicie la respuesta inmune adaptativa, es necesario que los linfocitos reconozcan al antígeno, que se expone sobre moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH en ratón o HLA en humano) en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Las células dendríticas son las más potentes y eficaces células presentadoras de antígenos.

2. Ciclo biológico y función de las células dendríticas

Las células dendríticas (CDs) juegan un papel clave en la iniciación de la respuesta inmunológica adaptativa, así como en la inducción de memoria inmunológica y tolerancia periférica (Mellman 2013).

Al igual que los monocitos y los macrófagos, las CDs derivan de progenitores hematopoyéticos de la médula ósea con un potencial de diferenciación mieloide.

Dichos progenitores mieloides dan lugar, tras sucesivas etapas de diferenciación, a pre-CDs que pasan al torrente circulatorio para posteriormente extravasarse a los tejidos periféricos (Geissmann, Manz et al. 2010). En estos tejidos, las CDs se encuentran en una fase de diferenciación denominada “inmadura” (figura 1). Las CDs inmaduras realizan una labor de “vigilantes” frente a patógenos invasores o señales de peligro. Este estado inmaduro se caracteriza por una alta capacidad endocítica, principalmente mediante macropinocitosis y fagocitosis, y una capacidad de presentación antigénica relativamente baja (Mellman 2013).

Cuando las CDs inmaduras se exponen a patógenos, PAMPs o citoquinas inflamatorias, experimentan una serie de cambios fenotípicos y funcionales, un proceso denominado maduración o activación (figura 1). Durante la maduración se reduce drásticamente la capacidad de capturar antígenos, aunque permanece la capacidad endocítica mediada por receptores (Yanagawa and Onoe 2003; Platt, Ma et al. 2010). Además, se activa la maquinaria de procesamiento antigénico y se incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, y HLA (CMH) (Dudek, Martin et al. 2013). También, durante este proceso disminuye la expresión de receptores de quimioquinas inflamatorias (CCR1, 2, 5 y CXCR1 y 2) y se incrementa considerablemente la expresión del receptor de quimioquinas CCR7. Este receptor controla la migración de las CDs maduras desde el foco de la inflamación hacia los ganglios linfáticos, siguiendo un gradiente de concentración de sus dos ligandos, las quimioquinas CCL21 y CCL19.

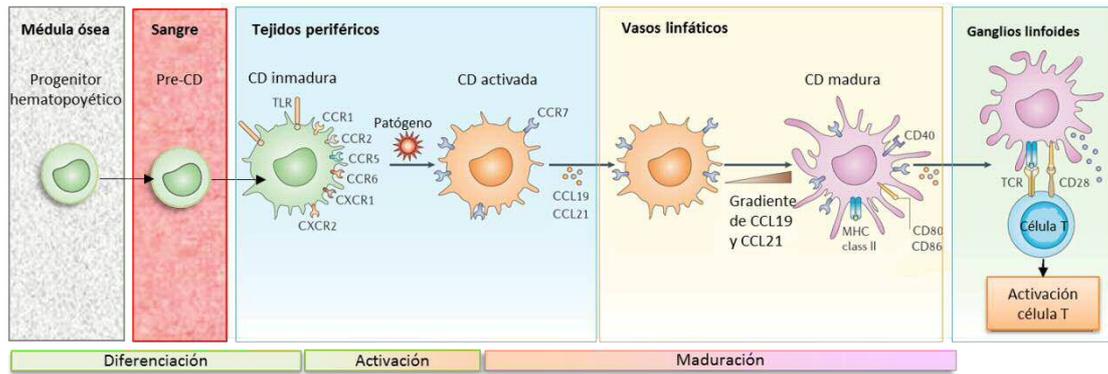


Figura 1. Ciclo biológico de las células dendríticas. Las células dendríticas (CDs) se originan en la médula ósea a partir de progenitores hematopoyéticos. Estos progenitores migran a través de los vasos sanguíneos a los tejidos periféricos, y durante este trayecto se produce su diferenciación a CDs inmaduras. En los tejidos periféricos, las CDs inmaduras actúan como “centinelas” que detectan microorganismos patógenos, PAMPs o DAMPs. Al activarse se modifica la expresión de sus receptores de membrana, disminuyendo la expresión de receptores inflamatorios (CCR1, 2, 5, 6 y CXCR1 y 2) y aumentando la expresión de CCR7, MHCII (CMHII), CD40, CD80 y CD86. CCR7 dirige las CDs a los ganglios linfáticos siguiendo el gradiente de concentración de los ligandos CCL19 y CCL21. En los ganglios, las CDs presentarán los antígenos endocitados previamente a las células T para comenzar una respuesta adaptativa. Modificado a partir de (Bachmann, Kopf et al. 2006).

Las CDs maduras, una vez localizadas en las zonas ricas en linfocitos T de los ganglios, presentarán los antígenos capturados en su fase inmadura a los linfocitos T que posean el receptor TCR específico para dichos antígenos. Estos linfocitos T se activarán, comenzarán a proliferar y migrarán al foco inflamatorio donde las CDs capturaron previamente los antígenos, generando así una respuesta adaptativa contra esos antígenos (Mempel, Henrickson et al. 2004; Krummel, Bartumeus et al. 2016).

Durante un proceso inflamatorio, los monocitos de sangre periférica pueden migrar a las zonas inflamadas y diferenciarse en CDs que contribuyen a la respuesta inmune contra la amenaza detectada (Qu, Brinck-Jensen et al. 2014). Además, existe un subtipo de CDs inmaduras que, aunque no han sido activadas por señales inflamatorias, expresan CCR7, lo que les permite migrar a los ganglios linfáticos continuamente transportando antígenos propios o agentes

ambientales inocuos. De esta manera presentan los antígenos a las células T junto con las señales necesarias para que éstas se conviertan en linfocitos T reguladores (tolerogénicos) (Mellman 2013). Por lo tanto, las CDs desempeñan un papel clave en la regulación del sistema inmunológico y la adquisición de tolerancia periférica.

3. Las quimioquinas y sus receptores

3.1 Las quimioquinas

Las quimioquinas (citoquinas quimiotácticas) son pequeños péptidos (8-14 KDa) que actúan como quimioatrayentes celulares. Mediante la unión a sus receptores específicos, las quimioquinas inducen la activación de diversas vías de transducción de señales intracelulares que regulan la migración y otras múltiples funciones celulares (Luster 1998; Lopez-Cotarelo, Gomez-Moreira et al. 2017). Debido a este importante papel, son necesarias para el correcto desarrollo y homeostasis de las células del sistema inmunológico (Griffith, Sokol et al. 2014). Las quimioquinas generalmente son secretadas al medio extracelular, a excepción de CX3CL1 (fractalquina), que es una proteína de membrana. Muchos de estos péptidos pueden unirse a proteínas sialiladas presentes en la superficie celular o a los proteoglicanos sulfatados que se presentan en la matriz extracelular. Debido a su afinidad por los proteoglicanos, al ser secretadas al exterior celular, pueden oligomerizar y permanecer concentradas localmente formando gradientes estables (Li, Pettersson et al. 2014).

Las quimioquinas constituyen una amplia familia compuesta por alrededor de 50 miembros que se clasifican atendiendo a la posición relativa de dos de sus cuatro residuos de cisteína (C) muy conservados, que se encuentran próximos al extremo N-terminal. De acuerdo con esta clasificación existen 4 familias de quimioquinas: CXC-, CC-, C- o y CX₃C-. Donde X representa a cualquier aminoácido (**figura 2**).

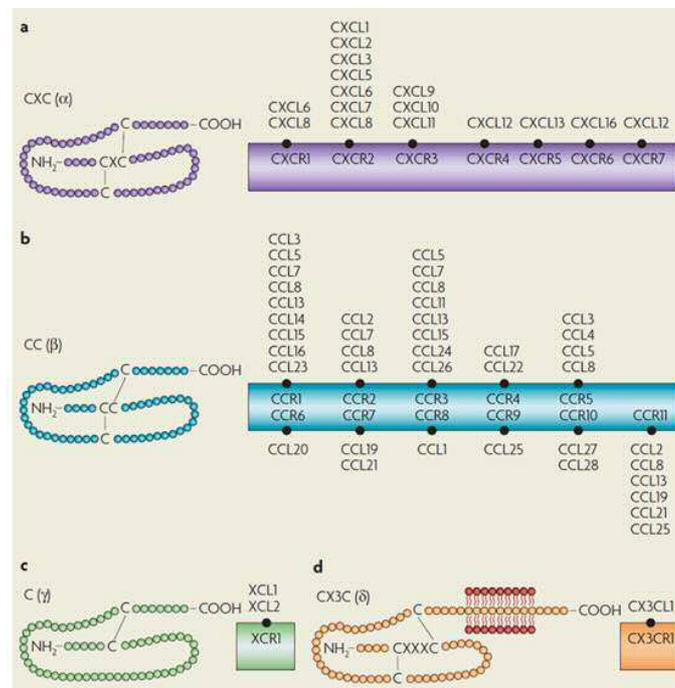


Figura 2. Tipos de quimioquinas. Las quimioquinas se clasifican en cuatro grupos, atendiendo a la posición relativa de dos de sus cuatro cisteínas más conservadas, en el extremo N-terminal: Quimioquinas tipo (CXC) (a), (CC) (b), (C) (c) y (CX₃C) (d). A la derecha de cada tipo se indican las quimioquinas descritas y sus receptores. (Rostene, Kitabgi et al. 2007)

Las quimioquinas CXC presentan un aminoácido no conservado entre ambas cisteínas y son quimioatrayentes de neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B y células Natural Killer (NK). Las quimioquinas CC-, en las cuales las cisteínas son adyacentes, son quimioatrayentes de monocitos, macrófagos, basófilos, linfocitos T y eosinófilos. Las quimioquinas C son aquellas que presentan sólo dos cisteínas

conservadas en lugar de cuatro (Kelner, Kennedy et al. 1994) y los únicos miembros de esta familia son la linfotactina α y la β , quimioatrayentes de linfocitos T. Por último, existe una quimioquina CX3C, con tres aminoácidos no conservados entre las dos primeras cisteínas, denominada fractalquina (Rollins 1997; Rostene, Kitabgi et al. 2007). Esta clasificación permite estandarizar la nomenclatura de estas moléculas de acuerdo con el grupo al que pertenecen (CC-, C-, CXC- o CX3C-), seguido de una L (ligando), todo ello seguido de un número (Bacon, Baggiolini et al. 2002) (**figura 2**).

Desde un punto de vista funcional, las quimioquinas además pueden agruparse en homeostáticas o inflamatorias, dependiendo de si regulan, a través de sus respectivos receptores, funciones celulares homeostáticas básicas o relacionadas con un proceso inflamatorio (Lopez-Cotarelo, Gomez-Moreira et al. 2017). Las quimioquinas homeostáticas controlan funciones como la migración constitutiva de los leucocitos y la organización de los órganos linfoides secundarios, mientras que las inflamatorias son secretadas en focos de inflamación, de manera transitoria, para reclutar a las células del sistema inmune encargadas de resolver dicho proceso inflamatorio (Lopez-Cotarelo, Gomez-Moreira et al. 2017).

3.2 Los receptores de quimioquinas

Las quimioquinas controlan las funciones celulares mediante su unión a receptores específicos en la superficie de las células. Los receptores de quimioquinas pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (*Guanine nucleotide binding proteins*) heterotriméricas (GPCR's o *G-protein-*

coupled-receptors). Los receptores de quimioquinas se clasifican en 4 grupos distintos atendiendo al tipo de quimioquina que unen: CCR-, CR-, CXCR- o CX3CR-, donde R significa receptor. Estos receptores se expresan en una gran cantidad de células (Zlotnik and Yoshie 2012; Lopez-Cotarelo, Gomez-Moreira et al. 2017) .

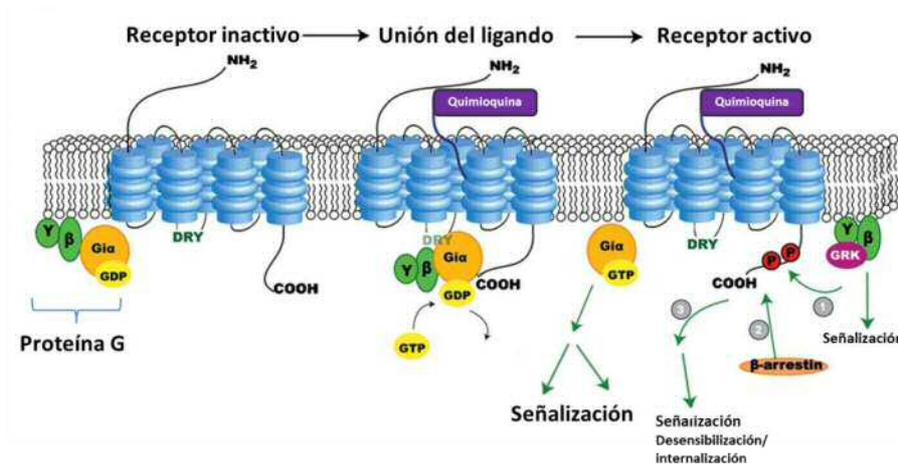


Figura 3. Estructura de un receptor de quimioquinas acoplado a proteína G: El receptor está formado por siete hélices alfa transmembrana. El extremo N-terminal está orientado hacia el exterior, donde interactúa con su ligando. La unión del ligando desencadena la interacción entre la proteína G acoplada y el receptor, a través del motivo DRY y el extremo C-terminal, desencadenando la separación de las proteínas G_α y G_{βγ}, iniciando la cascada de señalización hacia el interior celular. Moléculas como la β-arrestina regulan la internalización y desensibilización del receptor. Modificado a partir de (O'Hayre, Salanga et al. 2008).

Los receptores de quimioquinas están formados por siete hélices alfa que se encuentran insertadas en la membrana citoplasmática con un extremo N-terminal y tres bucles orientados hacia el exterior celular y un extremo C-terminal y otros tres bucles orientados hacia el citosol (figura 3). Las quimioquinas se unen a la región N-terminal (extracelular) del receptor, y el extremo C-terminal está relacionado con la internalización del receptor (Nibbs, Gilchrist et al. 2007). La capacidad de los receptores de quimioquinas de señalizar tras la unión del ligando reside fundamentalmente en la presencia de un motivo DRY (Aspártico, Arginina, Tirosina). Este motivo, que se encuentra cerca de la tercera región

transmembrana en el segundo bucle intracelular, está situado cerca de la zona de acoplamiento de la proteína G. El motivo DRY se encuentra muy conservado y su ausencia o mutación impide la señalización intracelular del receptor a través de la proteína G (Allen, Crown et al. 2007).

Las proteínas G heterotriméricas acopladas a los GPCR's transducen y amplifican la señal de la quimioquina al interior celular (**figura 3**). Éstas están constituidas por tres subunidades: una subunidad α , una subunidad β y una subunidad γ , de las cuales existen una gran variedad de subtipos. Sin embargo, las subunidades β y γ forman un dímero muy estable que sólo puede ser disociado en condiciones desnaturalizantes, por lo que $G_{\beta\gamma}$ constituye una unidad funcional. La subunidad G_{α} se encuentra unida, por un lado, a los bucles citosólicos del receptor de quimioquinas, y, por otro lado, al complejo $G_{\beta\gamma}$. Las proteínas G heterotriméricas se clasifican en cuatro familias dependiendo de la subunidad α que contienen: α_s , $\alpha_{i/o}$, $\alpha_{q/11}$, $\alpha_{12/13}$. La subunidad G_{α} contiene un dominio GTPasa que determina la conformación y estado de activación de la proteína G (Vogler, Barcelo et al. 2008). Las proteínas G alternan dos estados: un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. La unión del ligando al receptor GPCR desencadena el intercambio de GDP por GTP, en la subunidad α , lo que produce un cambio conformacional en G_{α} -GTP que separa dicha subunidad del dímero $G_{\beta\gamma}$, y ambas se liberan hacia el citoplasma, donde inician cascadas de señalización intracelular. La subunidad G_{α} posteriormente hidrolizará el GTP a GDP y volverá a su conformación inactiva, induciéndose la reasociación de las subunidad $G_{\beta\gamma}$, lo que termina con la señalización efectora (McCudden, Hains et al. 2005).

Los receptores de quimioquinas pueden regularse mediante un proceso de internalización y desensibilización que depende de unas proteínas adaptadoras denominadas β -arrestinas (**figura 3**). Se ha observado que la estimulación del receptor con su ligando induce que las proteínas GRK (G-receptor coupled kinase), PKA o PKC, fosforilen la región C-terminal del receptor creando un sitio de unión con las β -arrestinas, que inducen la internalización del receptor, e impiden que interaccione con la proteína G (Kohout and Lefkowitz 2003).

Existen unos receptores de quimioquinas denominados atípicos (Atypical Chemokine Receptors, ACRs) que carecen de motivos DRY o presentan motivos DRY alterados, de modo que no señalizan a través de las proteínas G. Se piensa que los receptores ACRs actúan como receptores “basurero” (*scavenger*) que regulan los niveles locales de quimioquinas (Ulvmar, Hub et al. 2011; Graham, Locati et al. 2012); aunque recientemente se ha descrito que algunos de estos ACRs pueden dimerizar con los receptores típicos regulando así su función (Nibbs and Graham 2013).

4. Las quimioquinas CCL19 y CCL21 y su receptor CCR7

4.1 CCL19 y CCL21

Las quimioquinas CCL19 y CCL21 son los únicos ligandos conocidos de CCR7 y se expresadas de manera constitutiva en los órganos linfoides secundarios. A pesar de que ambas quimioquinas se unen a CCR7 con afinidad similar y se expresan en los órganos linfoides, CCL19 y CCL21 difieren ligeramente en su estructura. También se han encontrado algunas diferencias en cuanto al tipo de

señalización que inducen al unirse a CCR7 (Bardi, Lipp et al. 2001; Kohout, Nicholas et al. 2004; Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2006; Byers, Calloway et al. 2008; Comerford, Harata-Lee et al. 2013).

CCL21 es una molécula de 14,5 KDa que posee una cola polibásica en su región C-terminal, la cual le permite unirse a glicosaminoglicanos (GAGs) de la matriz extracelular y al ácido polisialílico de la superficie celular (Weber, Hauschild et al. 2013). Por ello, esta quimioquina, además de encontrarse de forma soluble, se encuentra también adherida a la matriz extracelular de las células endoteliales, siendo capaz de inducir adhesión, fundamental para el proceso de extravasación (Comerford, Harata-Lee et al. 2013). En ratón se expresan dos isoformas de CCL21, como consecuencia de una duplicación génica, que difieren en un aminoácido (Leu o Ser) en posición 65 (CCL21 Leu 65 y CCL21 Ser 65) (Vassileva, Soto et al. 1999) y tienen un patrón de expresión distinto en el organismo (Nakano and Gunn 2001). Sin embargo, en humanos sólo existe el gen que codifica para la forma CCL21-Leu y se expresa en las células endoteliales de los vasos linfáticos aferentes de los ganglios linfáticos y en los vasos linfáticos de algunos órganos no linfoides, además de en las células estromales de la zona T de los ganglios y en las células epiteliales de la medula del timo (Comerford, Harata-Lee et al. 2013).

CCL19 es una molécula más pequeña, de 11 KDa, y comparte un 32% de homología de secuencia peptídica con CCL21, pero no presenta la extensión o cola polibásica en su extremo C-terminal, por lo que se encuentra de manera soluble y con una disponibilidad más local. CCL19 se produce en las células

reticulares del área T de los ganglios linfáticos y en las células epiteliales de la médula del timo, además, las propias CD_s maduras secretan CCL19 (Sallusto, Palermo et al. 1999).

El patrón de expresión de CCL19 y CCL21 permite que las células que expresan CCR7 migren desde los tejidos periféricos a los órganos linfoides a través de los vasos linfáticos aferentes. Aunque CCR7 es el receptor típico de CCL19 y CCL21, pueden unirse también a ACKR4 (previamente denominado CCR11 o CCX-CKR), que se expresa en las células reticulares de los ganglios linfáticos, las células epidérmicas y las epiteliales del timo. Se sabe poco acerca de la función de este receptor, pero se ha sugerido que, como todos los receptores de quimioquinas atípicos, ejerce una función de secuestro de estas quimioquinas como mecanismo regulador y parece tener un papel importante en el desarrollo y la selección de los linfocitos T (Heinzel, Benz et al. 2007; Bunting, Comerford et al. 2013).

4.2 CCR7

Este receptor se expresa en múltiples células, incluyendo linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, y una subpoblación de NKs. CCR7 se expresa además, de manera patológica, en diversas células cancerígenas (Mashino, Sadanaga et al. 2002; Ding, Shimada et al. 2003; Takanami 2003; Takeuchi, Fujimoto et al. 2004; Gunther, Leier et al. 2005; Muller, Sonkoly et al. 2006; Fang, Lee et al. 2008).

Los ratones KO para CCR7 (*Ccr7*^{-/-}) presentan órganos linfoides con una arquitectura y compartimentalización aberrante. Estos resultados sugieren que

CCR7 está implicado en el desarrollo y la organización de los órganos linfoides secundarios, debido a que regula la migración hacia los ganglios de leucocitos que son importantes para la organización de estas estructuras.

Se ha demostrado que la migración mediada por CCR7 en el timo es necesaria para el desarrollo de la **tolerancia central**. CCR7 regula la migración de los timocitos dentro del timo, necesaria para eliminación de células autorreactivas. Es por ello que en ratones KO para CCR7 se observa una elevada incidencia de autoinmunidad espontánea (Comerford, Harata-Lee et al. 2013).

Además de controlar la tolerancia central, CCR7 modula también la **tolerancia periférica**. La tolerancia periférica está relacionada con la continua migración constitutiva de las células dendríticas, cargadas con antígenos propios, desde los tejidos periféricos a los ganglios linfáticos para activar a las células T reguladoras, que inhiben a los linfocitos autoreactivos (Schneider, Meingassner et al. 2007; Maldonado and von Andrian 2010).

En los modelos KO para CCR7 también se observa un retraso en la inducción de una **respuesta inmunológica adaptativa**, debido nuevamente a la disminución en el número de CD4 y linfocitos T que migran a los ganglios (Forster, Schubel et al. 1999).

5. Funciones reguladas por CCR7 en las CD_s y vías de señalización intracelulares.

El receptor de quimioquinas CCR7 ha sido clásicamente estudiado como un receptor que regula la quimiotaxis; sin embargo, desde hace unos años se ha ido observando que regula otras funciones celulares importantes para el funcionamiento de las CD_s y el desarrollo de una respuesta inmunológica adaptativa. Entre estas nuevas funciones se incluyen la inducción de la maduración (Marsland, Battig et al. 2005), el control de la supervivencia (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009) y la regulación del citoesqueleto de actina, del que dependen algunas funciones como la endocitosis (Yanagawa and Onoe 2003; Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015), los cambios en citoarquitectura (Yanagawa and Onoe 2002; Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015) y en la velocidad migratoria de las células (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005).

Numerosos trabajos en los últimos años han ido elucidando la red de interacciones moleculares que controlan las funciones reguladas por CCR7 en las CD_s (**figura 4**). Las diversas cascadas de señalización activadas por CCR7 se pueden agrupar en tres módulos de señalización: el módulo regulador de la quimiotaxis, el módulo regulador de la supervivencia y el módulo regulador de la dinámica de la actina. Estos módulos presentan un alto grado de independencia porque se ha observado que cuando se inhibe uno de ellos, el resto de las funciones no se ven alteradas (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al.

2005; Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015). Hasta el momento sólo se ha identificado una conexión entre el módulo regulador de la quimiotaxis y el módulo de la supervivencia (Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015).

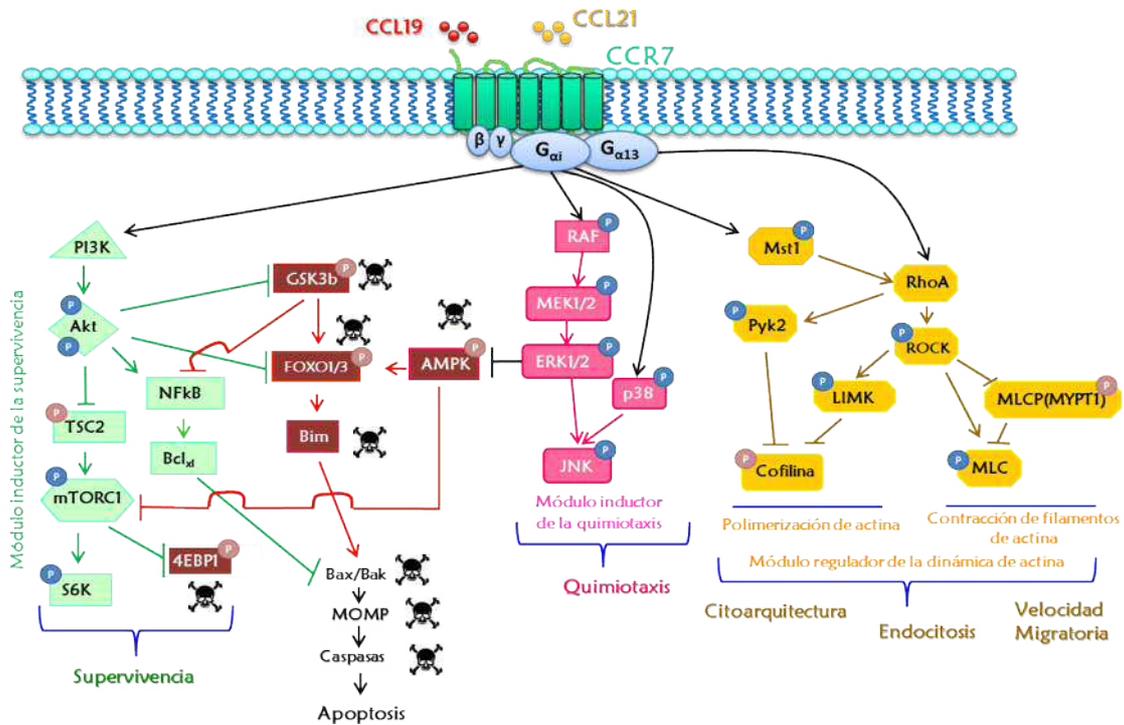


Figura 4. Esquema de las rutas de señalización intracelular activadas por CCR7 en las CD8: CCR7 controla tres complejos módulos de señalización que regulan la supervivencia, la quimiotaxis y la dinámica de la actina, que gobierna procesos de endocitosis, cambios en citoarquitectura y cambios en velocidad migratoria. **P** = fosforilación activadora, **P** = fosforilación inhibitoria.

5.1 CCR7 y la regulación de la quimiotaxis

La función clásica de CCR7, la quimiotaxis, está regulada por la vía de las MAP-quinasas (figura 4) (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005). CCR7, a través de la subunidad G α_i , induce una cascada de fosforilaciones que lleva a la activación secuencial de RAF (resultados no publicados) y MEK1/2, que fosforila y activa a ERK1/2. Por otra parte, CCR7 induce la activación de p38. ERK1/2 y p38 confluyen en la fosforilación y activación de JNK. Esta vía de señalización

controla la direccionalidad de las CD_s y permite que las células se dirijan hacia la fuente productora de la quimioquina.

5.2 CCR7 y la regulación de la supervivencia de las CD_s

La estimulación de CCR7 inhibe la apoptosis e induce supervivencia en las CD_s (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009; Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015).

CCR7 activa a través de Gαi a PI3K ([figura 4](#)), que estimula la activación de la quinasa AKT mediante su fosforilación en la treonina 308, mediada por PDK1 (no mostrado). También se induce la fosforilación de AKT en la serina 473, mediada por mTORC2 (no mostrado). Una vez fosforilada en ambos residuos y activa, AKT fosforila e inhibe a una serie de moléculas con efectos pro-apoptóticos en las CD_s, como los factores de transcripción FOXO1/3 y la proteína GSK3β (Escribano, Delgado-Martin et al. 2009; Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015). FOXO1/3 regula la transcripción de genes pro-apoptóticos como Bim y activa la cascada de caspasas, induciendo finalmente la apoptosis. Por otro lado, AKT también previene la apoptosis al fosforilar de manera inhibitoria a TSC2, permitiendo la activación de mTORC1. Este complejo de señalización induce supervivencia a través de la activación de la quinasa S6k y el bloqueo de 4EBP1, un inhibidor de la traducción (Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015).

Por otra parte, AKT activa directamente la ruta de NFκB, que promueve supervivencia (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004). AKT regula la

fosforilación de I κ B α , proteína que secuestra a NF κ B. La fosforilación de I κ B α desencadena su ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004). Una vez que NF κ B se encuentra libre, se trasloca al núcleo, donde activa la transcripción de genes relacionados con la supervivencia, como Bcl_{xl} (Escribano, Delgado-Martin et al. 2009).

Aunque hemos mencionado que los módulos activados por CCR7 presentan un alto grado de independencia, existe una conexión entre los módulos que regulan la quimiotaxis y la supervivencia a través de la proteína AMPK. Esta quinasa puede promover apoptosis induciendo la activación de FOXO1/3. Además, se sabe que AMPK también inhibe a mTORC1, que induce supervivencia en las CD_s. Tras la estimulación de CCR7, ERK1/2 fosforila de manera inhibitoria a AMPK en la serina 485. Dicha inhibición impide que AMPK, por un lado, active a FOXO1/3 y, por otro lado, inhiba a mTORC1, contribuyendo en aproximadamente el 20% supervivencia inducida por CCR7 en las CD_s (Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015).

5.3 CCR7 y la regulación del citoesqueleto de actina

El receptor CCR7, además de estar acoplado con la subunidad de la proteína G α i, también se acopla a la subunidad G α 13. La subunidad G α 13 activa una ruta de señalización que está implicada en la regulación de la dinámica de la actina (**figura 4**). Esta regulación del citoesqueleto de actina es necesaria para que tengan lugar los cambios morfológicos y el movimiento celular necesarios para que la migración celular se produzca correctamente.

Tras la unión de sus ligandos, CCR7 se activa y estimula la ruta de la GTPasa RhoA, por un lado, a través de la proteína acoplada G α i, que activa Mst1 (Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015) y, por otro lado, a través de la subunidad G α 13 acoplada a CCR7. Posteriormente, RhoA regula la actividad de las quinasas Pyk2 y ROCK, que activa a la quinasa LIMK. Ambas vías (Pyk2 y ROCK) convergen en la fosforilación inhibitoria de la cofilina-1, que resulta en una inhibición de su capacidad despolimerizadora de actina. Esta ruta, por tanto, impide la despolimerización de actina, pero, además, ROCK induce también la contracción de filamentos de actina al fosforilar y activar directamente a MLC, a la vez que bloquea a su inhibidor, la fosfatasa MYPT1. Estos efectos sobre la actina son fundamentales para que la célula lleve a cabo cambios en citoarquitectura, incremento la velocidad migratoria y la endocitosis activa de partículas (Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015).

6. El sistema ubiquitina-proteasoma

La degradación de proteínas debe ser un mecanismo perfectamente coordinado, eficiente y rápido en su ejecución para asegurar que una célula funcione correctamente. Las células eucariotas cuentan con una maquinaria que permite controlar la degradación proteica de manera eficiente, el Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) (figura 5). La especificidad y selectividad de este sistema radica en el marcaje de las moléculas destinadas a la degradación con una pequeña proteína denominada ubiquitina. La unión de varias moléculas de ubiquitina o poliubiquitinación de una proteína permite “etiquetarla”, generalmente, para ser degradada por un complejo molecular con actividad proteolítica denominado

proteasoma 26S (Hershko, Eytan et al. 1982; Hershko and Ciechanover 1998; Murata, Yashiroda et al. 2009; Tanaka 2009; Inobe and Matouschek 2014). El proceso de reconocimiento y “etiquetado” de una proteína con ubiquitina comprende 3 etapas con 3 tipos de enzimas (E1, E2 y E3).

El UPS es responsable de la degradación de entre el 80 y el 90% de las proteínas de la célula (Rock, Gramm et al. 1994). La desregulación del sistema UPS puede dar lugar a inestabilidad genómica y descontrol del ciclo celular, entre otros procesos, pudiendo desencadenar patologías como el cáncer, trastornos inmunológicos y neurológicos (Nakayama and Nakayama 2006; Paul 2008; Schmidt and Finley 2014; Skaar, Pagan et al. 2014).

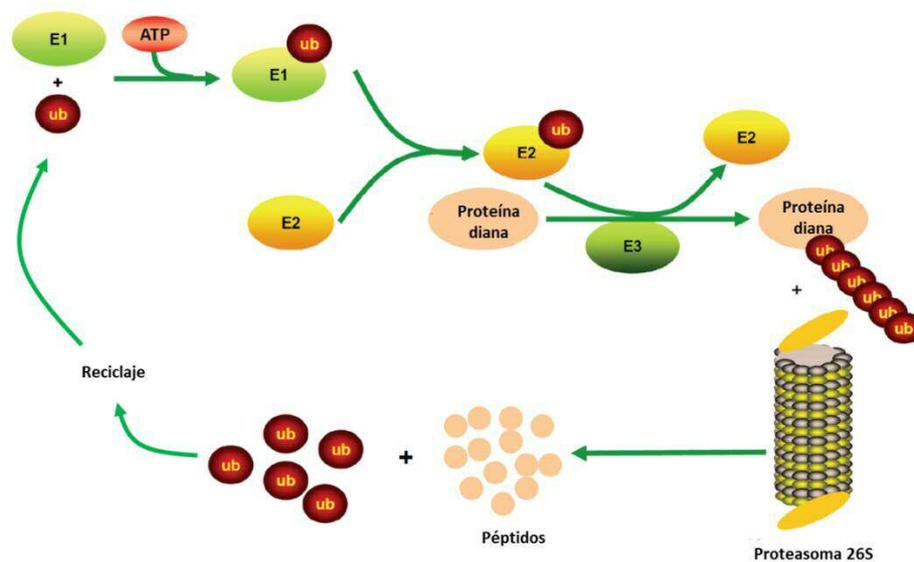


Figura 5. Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS): El sistema UPS está encargado de la degradación a través del proteasoma de proteínas “etiquetadas” con ubiquitina (Ub). El marcaje de la proteína diana se realiza en tres pasos por enzimas activadoras E1, conjugadoras E2 y ligasas E3 de Ub. Una vez que la proteína es degradada a pequeños péptidos por el proteasoma 26S, las Ub son recicladas para ser utilizadas nuevamente. Modificado de (Tu, Chen et al. 2012).

6.1 La ubiquitinación

a) Estructura y función de la ubiquitina

La ubiquitina (Ub) es una proteína de 76 aminoácidos y 8,5KDa muy conservada a lo largo de la evolución (Jentsch, Seufert et al. 1991). La ubiquitina presenta una glicina (G76) en su extremo C-terminal a través de la cual forma un enlace covalente con un grupo amino de un residuo presente en la proteína diana (figura 6). Además, la ubiquitina presenta siete residuos de lisina (K o Lys) (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), altamente conservados, a través de los cuales establece enlaces con la G76 de otras ubiquitinas y genera las cadenas de poliubiquitina (Pickart and Eddins 2004; Pickart and Fushman 2004) (ilustrado más adelante en la figura 8).

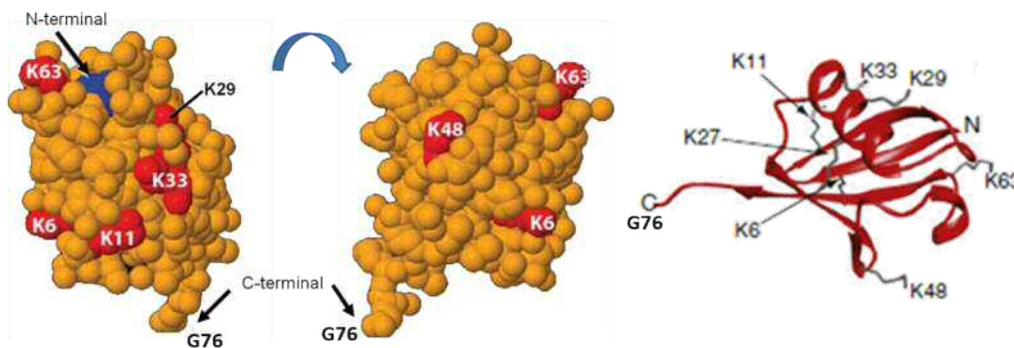


Figura 6. Estructura de la Ubiquitina: La ubiquitina presenta una estructura globular en la cual son fundamentales un residuo de glicina en el extremo C-terminal (G76) y siete residuos de lisina conservados (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), necesarios para la interacción con el sustrato y la formación de cadenas de poliubiquitina. Modificado a partir de (Neutzner and Neutzner 2012) y (Metzger, Pruneda et al. 2014).

b) Las proteínas similares a Ubiquitina (ULMs)

A lo largo de la evolución se ha generado una familia de proteínas, conocidas como proteínas similares a ubiquitina (ubiquitin-like modifier proteins o ULMs),

que comparten cierta similitud en secuencia y estructura con la ubiquitina (Cappadocia and Lima 2017). Estas proteínas no solo comparten parte de su secuencia de aminoácidos, sino también la capacidad de formar enlaces isopeptídicos entre la glicina de su extremo C-terminal y un grupo amino de la proteína diana (Pickart and Fushman 2004). La familia de proteínas ULMs está formada por alrededor de 20 miembros involucrados en la modificación post-traducciona de proteínas (Hochstrasser 2009; van der Veen and Ploegh 2012). Entre este grupo de proteínas se encuentra **Nedd8** (“Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated protein 8”), una pequeña proteína de 81 aminoácidos y 9 KDa que presenta un ~60% de identidad con la secuencia de la ubiquitina (Kumar, Yoshida et al. 1993; Kamitani, Kito et al. 1997; Pickart and Eddins 2004; Soucy, Dick et al. 2010; Enchev, Schulman et al. 2015).

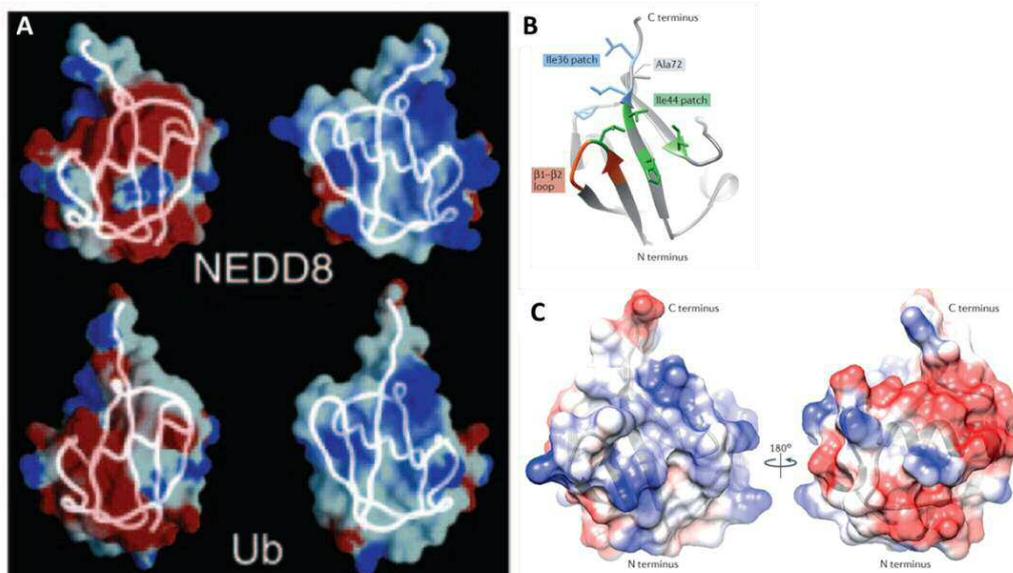


Figura 7. Estructura de Nedd8 destacando su similitud con la ubiquitina (A) Representación tridimensional de las estructuras de Nedd8 y Ubiquitina ilustrando su potencial electrostático (negativo en rojo y positivo en azul). Se observa una gran similitud entre ambas proteínas. (Herrmann, Lerman et al. 2007) **(B)** y **(C)** Estructura de Nedd8. Nedd8 consiste en una estructura globular con dos parches hidrofóbicos (*patch*), Ile44 e Ile36 que median la interacción con otras proteínas y dos lazos (*loop*), $\beta 1$ y $\beta 2$. (Enchev, Schulman et al. 2015)

Nedd8 se compone de una cola C-terminal que finaliza con dos glicinas, a través de las cuales se forma el enlace covalente con la molécula diana (Enchev, Schulman et al. 2015) (**figura 7**). El cuerpo globular posee dos parches hidrofóbicos, de carga neutra, que existen también en la ubiquitina, y son los encargados de mediar interacciones con otras proteínas, y un lazo entre las láminas $\beta 1$ y $\beta 2$ (**figura 7B**). También posee unas regiones polares que no están presentes en la ubiquitina y que probablemente influyen las funciones específicas de Nedd8 (**figura 7A**). Aunque se asemeja mucho a la Ub en secuencia y estructura, la unión de Nedd8 a las proteínas (o nedilación) no induce directamente su degradación por el proteasoma, sino que se ha visto relacionada con la modificación de la conformación una proteína, su estabilidad o su capacidad para formar enlaces con otras moléculas, regulando así su función (Rabut and Peter 2008; Deshaies and Joazeiro 2009; Enchev, Schulman et al. 2015).

c) Proceso de ubiquitinación

Para que se lleve a cabo la ubiquitinación, es necesario que la molécula precursora de la ubiquitina sufra un corte proteolítico en una zona del extremo C-terminal que permite exponer el residuo de G76, de tal manera que puede ser ligada a una proteína diana.

La unión de ubiquitinas a un sustrato (**figura 8**) requiere tres tipos de enzimas, que actúan de manera secuencial: las enzimas activadoras de ubiquitina (E1), las enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) y las enzimas ligasas de ubiquitina

(E3)(Pickart and Eddins 2004). El genoma humano codifica 2 enzimas E1, 37 enzimas E2 y unas 600 ligasas E3 de ubiquitina, que catalizan la transferencia de una molécula de ubiquitina a la proteína diana (Bulatov and Ciulli 2015).

- **Enzimas activadoras de ubiquitina (E1):** Estas enzimas se encargan de adenilar a la ubiquitina en su extremo C-terminal, utilizando una molécula de ATP. Este proceso permite la formación de un enlace tioéster entre una cisteína del centro activo de la E1 y el residuo de glicina (G76) del extremo C-terminal de la ubiquitina, activándose la ubiquitina (Handley, Mueckler et al. 1991; Groen and Gillingwater 2015).
- **Enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2):** Reciben la ubiquitina activada de la E1 y forman de nuevo un enlace tioéster entre su centro activo y la ubiquitina. Las E2 funcionan como un intermediario entre las E1 y las E3. El mecanismo de acción de las E2 depende del tipo de E3 con el que han de interaccionar. Cada enzima E2 puede interaccionar con varias E3 (Glickman and Ciechanover 2002; Lecker, Goldberg et al. 2006).
- **Enzimas ligasas de ubiquitina (E3):** Las denominaremos E3 ligasas a lo largo de esta tesis. Catalizan la “ligación” de la ubiquitina a la proteína diana, y lo pueden hacer de dos maneras distintas. Directamente, recibiendo la ubiquitina de la E2, uniéndola, y transfiriéndola a la proteína diana, o indirectamente, reclutando a la proteína diana y permitiendo que la E2 le transfiera la ubiquitina (ver más adelante en la [figura 10](#)). En este proceso se forma un enlace covalente isopeptídico entre la ubiquitina y el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana. Aunque la lisina es el residuo aceptor

más común, es también posible que otros residuos funcionen como sitios de ubiquitinación, como los residuos de cisteína y serina (Herrmann, Lerman et al. 2007; McDowell and Philpott 2013).

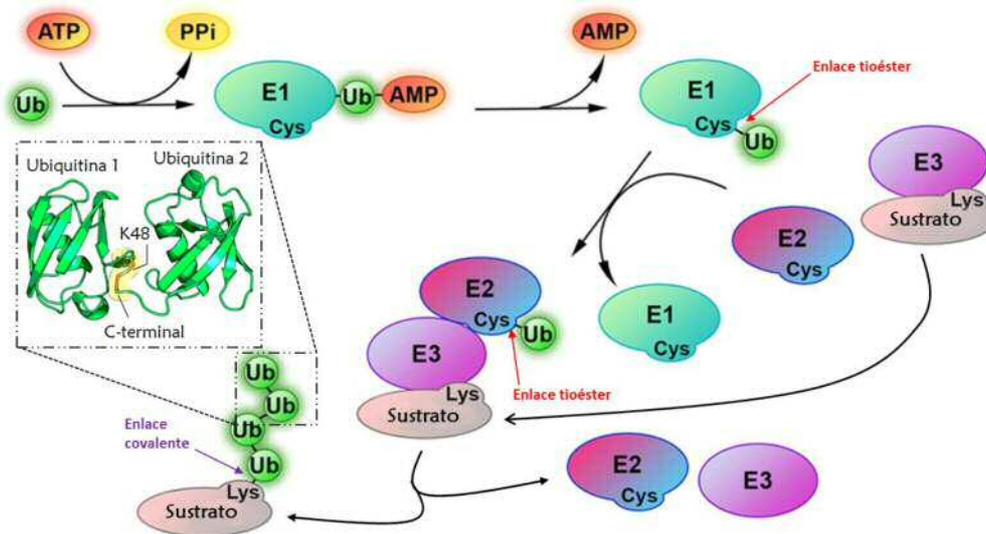


Figura 8. Esquema del proceso de ubiquitinación: La ubiquitina es activada por enzima E1 mediante un proceso de adenilación con consumo de ATP. La ubiquitina forma un enlace tioéster con la cisteína del centro activo de la E1, que la transfiere del mismo modo a una cisteína en la enzima E2 y, por último, la ubiquitina se transfiere al sustrato, acoplado a una enzima E3 ligasa, mediante la formación de un enlace covalente con una lisina del mismo. Posteriormente, se lleva a cabo la adición de más moléculas de ubiquitina o poliubiquitinación. Modificado a partir de (Valimberti, Tiberti et al. 2015)

La poliubiquitinación o elongación de las cadenas de ubiquitina se produce mediante la formación de un enlace isopeptídico entre el residuo G76 en posición C-terminal de una ubiquitina y el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina (K) de la siguiente molécula de ubiquitina. Puesto que las ubiquitinas poseen 7 lisinas conservadas (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), se pueden formar muchos tipos de enlaces con otras ubiquitinas o con proteínas diana. Cada tipo de enlace se ha visto relacionado con un destino específico de la proteína diana, hablándose de un “código de ubiquitinación” (Komander 2009; McDowell and Philpott 2013) (figura 9). La degradación de proteínas en el proteasoma depende

principalmente de cadenas de ubiquitina unidas a través de la K48 (Hershko and Ciechanover 1998; Thrower, Hoffman et al. 2000), aunque también puede ocurrir a través de la K11 (Jin, Williamson et al. 2008).

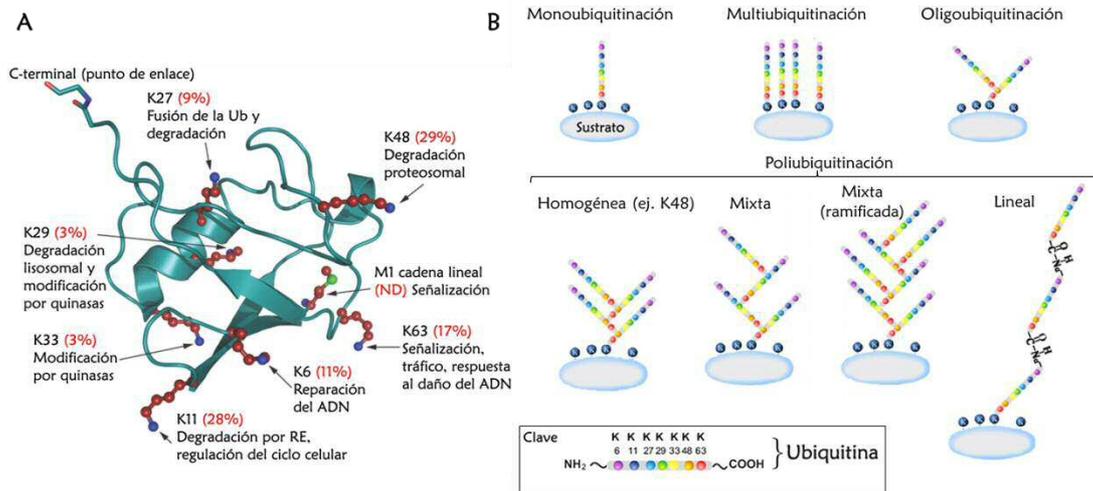


Figura 9. Tipos de ubiquitinación y destino de las proteínas ubiquitinadas. (A) Las ubiquitinas (Ub) pueden formar enlaces a través de sus 7 lisinas conservadas. Cada tipo de enlace se ha visto relacionado con diferentes destinos para una proteína. En la figura se detalla la abundancia relativa con la que se encuentra cada tipo de ubiquitinación. (B) La clave de colores representa los distintos residuos de Ub. Las proteínas pueden ser marcadas por una Ub (monoubiquitinación), varias moléculas de Ub en diferentes residuos de lisina (multiubiquitinación), cadenas cortas Ub (oligoubiquitinación) o cadenas más largas (poliubiquitinación) que pueden ser, tanto homogéneas como heterogéneas. También se puede dar la elongación de cadenas de Ub de manera lineal, unidas entre sí a través de su extremo N-terminal. Modificado de (Komander 2009)(A) y (Kravtsova-Ivantsiv and Ciechanover 2012)(B).

Otros residuos, como la ubiquitinación en K63, ha sido asociados mayormente con la modificación de la función de las proteínas, pudiendo estar involucrados en múltiples vías, como la respuesta al daño en el ADN (Glickman and Ciechanover 2002; Komander 2009), aunque recientemente se ha sugerido que K63, también puede estar involucrada en la degradación a través del proteosoma (Ohtake, Tsuchiya et al. 2018). Además, existen otros tipos de ubiquitinación menos comunes, como las cadenas de poliubiquitina de tipo mixto, combinando uniones de ubiquitinas a través de diferentes lisinas (Emmerich, Ordureau et al. 2013; Meyer and Rape 2014; Kristariyanto, Abdul

Rehman et al. 2015), la formación de cadenas de ubiquitina ramificadas, la multiubiquitinación, o la ubiquitinación lineal a través de la metionina 1 (M1) del extremo N-terminal (Rieser, Cordier et al. 2013).

Se ha demostrado que para que una proteína sea degradada por el proteasoma requiere llevar unida una cadena de al menos 4 moléculas de ubiquitina (Thrower, Hoffman et al. 2000).

6.2 Las ligasas E3 de ubiquitina

Como se ha mencionado anteriormente, las enzimas E3 ligasas son las encargadas de seleccionar específicamente las proteínas destinadas a ser ubiquitinadas. Estas moléculas reconocen modificaciones en las proteínas, como fosforilaciones, que las hacen más susceptibles de ser ubiquitinadas y degradadas (Lucas and Ciulli 2017).

a) Tipos de ligasas E3 de ubiquitina

Las enzimas E3 ligasas se clasifican en 4 grupos atendiendo al motivo estructural que poseen: ligasas E3 con dominios HECT (Kee and Huibregtse 2007; Metzger, Hristova et al. 2012), ligasas E3 con dominio PHD-finger (Pascual, Martinez-Yamout et al. 2000; Coscoy and Ganem 2003; Bienz 2006), ligasas E3 con dominios U-box (Hatakeyama and Nakayama 2003; Hatakeyama and Nakayama 2003; Metzger, Pruneda et al. 2014) y ligasas E3 con dominio RING-finger. En esta tesis nos centramos en las ligasas E3 con dominio RING-finger.

Ligasas E3 con dominio RING-finger (“Really Interesting New Gene”)

Estas enzimas contienen un dominio RING formado por entre 40 y 100 aminoácidos con 8 residuos conservados de cisteína e histidina que coordinan dos átomos de Zn^{2+} formando una estructura de abrazaderas cruzadas (“zinc-finger”). Esta zona crea una plataforma que sirve de anclaje para las E2 ligasas (Yi and Ehlers 2007). En las E3 ligasas de tipo RING-finger, a diferencia de otras, como las HECT, la E2 cargada con ubiquitina se ancla en una región de la E3, mientras que el sustrato se ancla en otra zona de la E3, de modo que la E2 transfiere la ubiquitina directamente al sustrato sin pasar por la E3, es decir, sin formarse ningún enlace entre la E3 y la ubiquitina (figura 10).

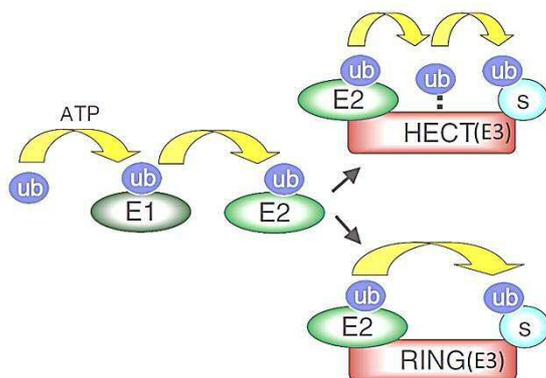


Figura 10. Ligasas E3 de ubiquitina tipo HECT y tipo RING-finger. Ambas ligasas reciben la ubiquitina de una enzima E2; sin embargo, mientras las E3 tipo HECT forman un enlace con la ubiquitina antes de transferirla al sustrato (s), las de tipo RING no establecen ningún enlace con la ubiquitina, sino que la transfieren directamente de la E2 al sustrato. Modificado a partir de (Nethe and Hordijk 2010)

Dentro de las E3 ligasas de tipo RING-finger, puede ocurrir que la E2 y el sustrato se anclen dentro de la misma proteína RING-finger (como muestra la figura 10), o que la proteína RING-finger se encuentre formando un conjunto con otras proteínas dando lugar a un Complejo E3 ligasa (Metzger, Pruneda et al. 2014) (figura 11), donde se requiere la actividad catalítica de la RING-finger y la presencia de una serie de adaptadores. Al segundo grupo, de tipo multimérico,

pertencen los complejos E3 ligasa mejor descritos, los complejos tipo CRL (“Cullin-containing RING-E3 ligase”) y el complejo APC (“Anaphase promoting complex”).

Los **CRL** son complejos E3 ligasa que están formados, de manera general, por una E3 ligasa tipo RING-finger, una proteína que reconoce al sustrato (receptora del sustrato), una proteína adaptadora y una proteína de ensamblaje de la familia Cullin, que sirve como soporte a las dos anteriores para permitir la interacción de la E2-Ub con el sustrato a ubiquitinar (Zheng, Schulman et al. 2002)(figura 11).

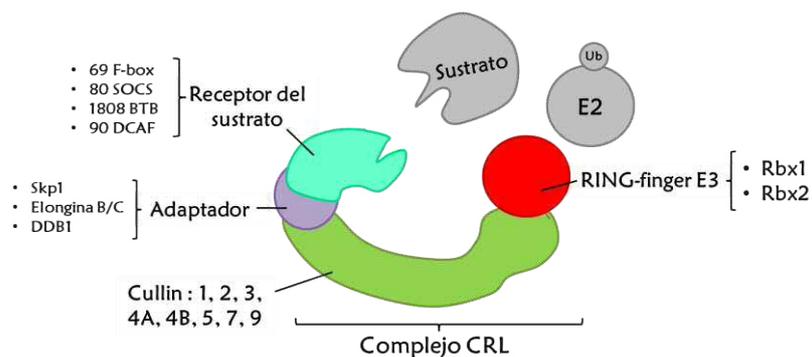


Figura 11. Los complejos E3-ligasa tipo CRL están formados por una proteína de ensamblaje de la familia Cullin que ancla por un lado una proteína adaptadora que lleva unida una proteína receptora del sustrato, encargada de reconocer y unir el sustrato. Por el otro lado, Cullin se encuentra unida a la enzima RING-finger, que interacciona con la enzima E2 cargada con ubiquitina para que pueda producirse la ubiquitinación del sustrato.

Las proteínas de la familia Cullin se caracterizan por un dominio de homología *cullin* muy conservado (“cullin-repeat domain”) de unos 150 aminoácidos en su región C-terminal y se denominaron así por su pertenencia a un complejo capaz de “seleccionar” y ubiquitinar proteínas (“to cull” = “to choose in a negative way, discard”) (Sarikas, Hartmann et al. 2011). Este dominio es responsable de la interacción con la RING-finger E3 (Zheng, Schulman et al. 2002), mientras que el

extremo N-terminal es el encargado de anclarse a otras proteínas adaptadoras. Existen 8 tipos de complejos CRL (CRL1, 2, 3, 4A, 4B, 5, 7 y 9) dependiendo de la proteína Cullin que posean (Cul-1, -2, -3, -4A, -4B, -5, -7 y -9/PARC).

Además, estos CRLs varían según la RING-finger E3 y las proteínas adaptadoras que posean. En humanos existen 2 componentes RING-finger E3 (Rbx1 y Rbx2), y 4 proteínas adaptadoras, Skp1 (para Cul-1 y -7), Elongina B/C (para Cul-2 y -5) y DDB1 (para Cul-4A/B)(Zhao and Sun 2013).

Las proteínas adaptadoras son las que se anclan a la proteína Cullin e interaccionan con las proteínas encargadas del reconocimiento del sustrato. Éstas son muy variables, y en ellas radica la especificidad de las E3-ligasas. Existen 69 proteínas de tipo **F-box** (Jin, Cardozo et al. 2004) para CRL-1 (CRL con Cul-1), 80 proteínas **SOCS** para CRL-2 y -5, aproximadamente 180 proteínas **BTB** para CRL-3 y unas 90 proteínas **DCAF** para CRL-4A y -4B (Linossi and Nicholson 2012). Por lo tanto, las más de 400 proteínas se combinan para dar lugar a infinidad de complejos CRL encargados de ubiquitinar alrededor del 20% de las proteínas celulares degradadas en el proteasoma (Deshaies and Joazeiro 2009; Sarikas, Hartmann et al. 2011; Skaar, Pagan et al. 2014).

6.3 El complejo SCF (CRL-1)

El complejo CRL-1 ha sido el complejo CRL más estudiado ya que contiene a Cul-1 (gen conocido también como Cdc53) la proteína de la familia Cullin mejor caracterizada (Kipreos, Lander et al. 1996; Willems, Lanker et al. 1996). CRL-1 es

conocido también como SCF (Skp1-Cul-1-Fbox) y con ese nombre nos referiremos a él a partir de ahora.

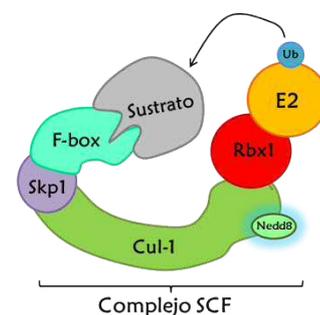
El complejo SCF (**figura 12**), está formado por 3 componentes invariables, Rbx1 (la E3 ligasa tipo RING-finger), Cullin-1 (proteína de ensamblaje, Cul-1) y Skp1 (proteína adaptadora), que se une a un componente variable, la proteína receptora del sustrato, de la familia de proteínas F-box (Cenciarelli, Chiaur et al. 1999; Craig and Tyers 1999; Winston, Koepf et al. 1999; Zhao and Sun 2013; Bulatov and Ciulli 2015; Zheng, Zhou et al. 2016; Reitsma, Liu et al. 2017). Las proteínas Skp1 y F-box, son las responsables del reconocimiento del sustrato y de la especificidad del proceso de ubiquitinación por las E3.

En humanos se han descrito 69 proteínas F-box, pero solo el 5% de estas proteínas ha sido estudiado. Las proteínas F-box reconocen modificaciones en los sustratos (fosforilación, glicosilación, hidroxilación, acetilación, etc.) que les permiten interactuar con ellos para que se lleve a cabo el proceso de ubiquitinación (Skaar, Pagan et al. 2013; Wang, Liu et al. 2014; Lucas and Ciulli 2017). De este modo, la proteólisis mediada por SCF depende tanto de la disponibilidad de las proteínas F-box, como de las modificaciones que presenten los sustratos (Nakayama and Nakayama 2006).

El complejo SCF posee una estructura (**figura 12**) en la cual Cul-1 aparece como una plataforma central elongada que une, por su extremo N-terminal al complejo formado por Skp1-F-box (“módulo de reconocimiento del sustrato”), y por su extremo C-terminal a la E3 Rbx1 (Zheng, Schulman et al. 2002). La región

N-terminal de Cul-1 está muy conservada entre especies, pero no con otras proteínas de la familia Cullin (Bulatov and Ciulli 2015). Rbx1, la E3 ligasa de tipo RING-finger asociada a SCF, se incorpora en la región C-terminal de Cul-1 y posee una región RING-finger un poco diferente al resto, puesto que, además de los dos átomos de Zn^{2+} que normalmente presentan estas enzimas, posee una inserción de 20 residuos que permiten la unión de un tercer átomo de Zn^{2+} y la formación de un tercer zinc finger (Zheng, Schulman et al. 2002).

Figura 12. El complejo SCF: El complejo SCF está formado por Cul-1, que hace de plataforma conectora entre Skp1, F-box y el sustrato con la E3-RING finger, Rbx1, que entra en contacto con la enzima E2 cargada con ubiquitina. Para que la transferencia de ubiquitina ocurra, Cul-1 debe encontrarse nedilado.



6.4 Regulación de la actividad de SCF

La regulación de la actividad de SCF es muy compleja, pues depende de la disponibilidad y estabilidad de todos los componentes necesarios para el ensamblaje del SCF, así como de la disponibilidad de la E2 ligasa cargada con ubiquitina y de los sustratos a ubiquitinar. Estos últimos, además deben encontrarse con las modificaciones postraduccionales necesarias para poder ser reconocidos por las F-box (Lucas and Ciulli 2017). Por otro lado, la regulación de SCF depende de la existencia de componentes que activen o inactiven el complejo. Se trata de un equilibrio muy complejo de unión y separación de unidades que puede desviarse hacia un destino u otro, dependiendo de la disponibilidad y estado de dichas unidades.

a) Activación de SCF por nedilación

Todos las CRLs son activados mediante la modificación de un residuo de lisina (K) en la proteína Cullin. Esta modificación consiste en la unión covalente de Nedd8, un proceso conocido como nedilación. De este modo, el complejo SCF se activa cuando Cul-1 es nedilado (**figura 12**) (Duda, Borg et al. 2008). La nedilación estimula la actividad de SCF a través de varios mecanismos. La nedilación de Cul-1 ayuda a reclutar a la E2 cargada con ubiquitina gracias a la capacidad que tiene Nedd8 de unirse, además de a Cul-1, a la E2 cargada con Ub (Read, Brownell et al. 2000; Kawakami, Chiba et al. 2001; Petroski and Deshaies 2005; Sakata, Yamaguchi et al. 2007). Sin embargo, el reclutamiento de la E2-Ub y de los adaptadores de reconocimiento del sustrato no son suficientes para que la ubiquitinación del sustrato se lleve a cabo, debido a que, de manera constitutiva, el complejo (Rbx1, Cull1, Skp1-Fbox-sustrato) se encuentra en una conformación más o menos rígida que mantiene un espacio de 50Å entre la E2-Ub y el sustrato, una distancia que no permite que se transfiera la ubiquitina al mismo (**figura 13**). En este sentido, la unión de Nedd8 a Cul-1 provoca un cambio conformacional en el complejo SCF que le aporta flexibilidad, sobre todo a la región E3-E2-Ub, de modo que es capaz de reorientarse, acercarse al sustrato y transferirle la ubiquitina (Merlet, Burger et al. 2009).

La ubiquitinación se lleva a cabo en dos pasos, primero se produce la transferencia de la primera ubiquitina a un residuo de K del sustrato y después la unión de más ubiquitinas a la primera ubiquitina, esto es, la elongación de la cadena de poliubiquitinas. Se sabe que la unión de Nedd8 a Cul-1 estimula

ambos procesos (Petroski and Deshaies 2005; Duda, Borg et al. 2008; Merlet, Burger et al. 2009; Boh, Ng et al. 2011; Duda, Scott et al. 2011; Onel, Sumbul et al. 2017).

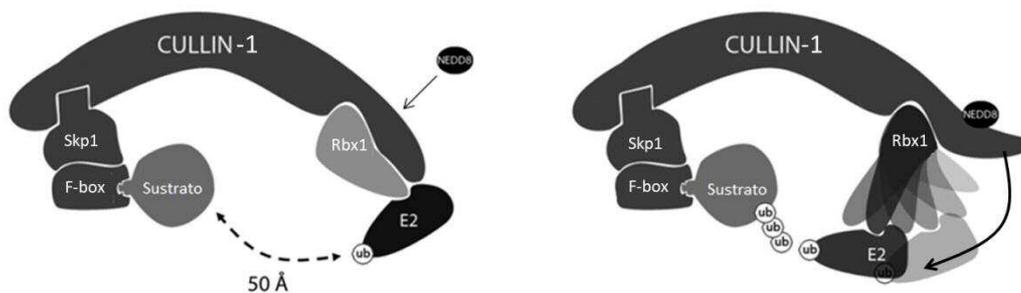


Figura 13. Activación de SCF por nedilación de Cul-1: Cuando Cul-1 es nedilado, sufre un cambio conformacional que modifica su interacción con Rbx (RING)-E2-Ub haciéndola más flexible y permitiendo que se reoriente hacia el sustrato. Esto provoca que se cierre el espacio de 50Å existente entre la E2 y el sustrato, permitiendo así la transferencia de ubiquitina. Modificado de (Merlet, Burger et al. 2009)

Nedilación

Nedd8 es una proteína similar a ubiquitina y el proceso de nedilación es análogo al proceso de ubiquitinación (Liakopoulos, Doenges et al. 1998; Cappadocia and Lima 2017). Al igual que la ubiquitina, Nedd8 debe sufrir un procesamiento inicial (Linghu, Callis et al. 2002; Coleman, Bekes et al. 2017). La enzima proteolítica UCHL3 procesa tanto a la ubiquitina como a Nedd8 (Wada, Kito et al. 1998), aunque otra enzima, DEN1 (llamada también SENP8), procesa exclusivamente a Nedd8 y además tiene la capacidad de desacoplarlo de algunos sustratos (Kurihara, Semenova et al. 2000; Chan, Yoon et al. 2008).

La nedilación, al igual que la ubiquitinación, depende de 3 pasos en los que participan una enzima E1, una enzima E2 y una enzima E3 (figura 14). La E1 o

NAE (“Nedd8 Activation Enzyme”), es un heterodímero formado por **Uba1** (NAE1 o APPBP1) y **Uba3**, la E2 o NCE (“Nedd Conjugation Enzyme”), es **Ubc12**, y la Nedd-E3-ligasa, en el caso de SCF, es **DCN1-like protein 1 (DCUN1D1)** (Dcn1 en levaduras) (Kurz, Chou et al. 2008; Chung and Dellaire 2015; Keuss, Thomas et al. 2016). También se ha demostrado que Rbx1 es esencial para que la nedilación se lleve a cabo, puesto que Rbx1 es capaz de unirse tanto a la Nedd8-E2, Ubc12, como a la Nedd8-E3, DCUN1D1, que catalizan el proceso de transferencia de Nedd8 a Cul-1 (Kamura, Conrad et al. 1999; Morimoto, Nishida et al. 2003; Yang, Zhou et al. 2007).

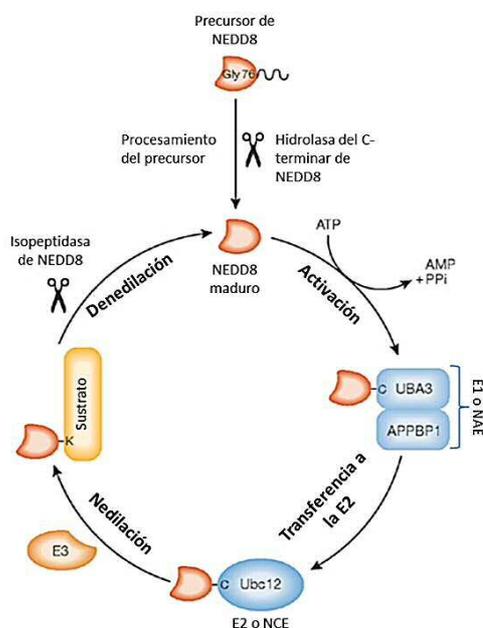


Figura 14. Mecanismo de la nedilación. El mecanismo es similar al de la ubiquitinación, esto es, consta de tres etapas en las que intervienen tres tipos de enzimas. Inicialmente, la proteína precursora de Nedd8 tiene que sufrir un corte proteolítico en una zona del extremo C-terminal, que lleva a cabo DEN1 (SENP8). Posteriormente, Nedd8 se activa mediante un proceso mediado por la enzima E1, el dímero UBA3/APPBP1, para luego transferirse a una enzima E2, Ubc12, la cual, asistida por la enzima E3, transferirá la molécula de Nedd8 a la proteína diana. Modificado de (Rabut and Peter 2008).

Se ha observado que, del conjunto total de proteínas Cullin, solo una pequeña fracción se encuentra nedilada basalmente (~10%), lo que indica que solo una pequeña parte de los complejos CRLs se encuentra completamente activo (Bennett, Rush et al. 2010; Emberley, Mosadeghi et al. 2012). Además, se ha demostrado que el residuo K720 es fundamental para que se forme el enlace

entre Nedd8 y Cul-1, y, por tanto, para que el complejo SCF se active (Furukawa, Zhang et al. 2000; Yue, Ma et al. 2018).

b) Denedilación y secuestro Cul-1

La nedilación es un proceso reversible. Un mecanismo de regulación del complejo SCF consiste en la eliminación de Nedd8 de Cul-1, proceso conocido como denedilación. Este proceso lo lleva a cabo el señalosoma COP9 (CSN), un complejo multimérico con actividad metaloproteasa que cataliza la separación de Nedd8 de las proteínas Cullin, regulando así la actividad de las CRLs (Schmaler and Dubiel 2010; Chung and Dellaire 2015). Sin embargo, el efecto de CSN sobre SCF no es del todo inhibitorio puesto que diferentes estudios indican que los ciclos de nedilación y denedilación de SCF favorecen la renovación de sus componentes y el correcto funcionamiento de este complejo. Además, la función denedilante de CSN estabiliza las F-box previniendo la autoubiquitinación de SCF (Zhou, Wee et al. 2003; He, Cheng et al. 2005; Wee, Geyer et al. 2005; Bosu and Kipreos 2008).

En ausencia de nedilación, las proteínas Cullin (excepto Cul-7) pueden formar un complejo con la proteína Cand1 ("cullin associated Nedd8 dissociated protein 1"), que compite con Skp1 por la unión a Cul-1 y obstruye la región de unión de Cul-1 con el complejo Skp1-Fbox-sustrato. La nedilación de Cul-1 disocia a Cand1 y permite la asociación del complejo Skp1-F-box-sustrato y la formación del SCF (Liu, Furukawa et al. 2002; Zheng, Yang et al. 2002; Goldenberg, Cascio et al. 2004; Reitsma, Liu et al. 2017). También se ha observado que la presencia de

Skp1 y altas concentraciones de ATP pueden provocar la disociación de Cand1 de Cul-1 (Zheng, Yang et al. 2002). Al igual que en el caso del CSN, se ha descrito recientemente que el efecto de Cand-1 sobre SCF no es inhibitorio como se pensaba, sino que se ha demostrado que es necesaria la presencia de Cand1 para la degradación eficiente de los sustratos de SCF, además de para estabilizar al complejo y reclutar las enzimas de nedilación, proceso que luego provocará su separación de SCF (Liu, Reitsma et al. 2018).

En resumen, CSN y Cand1 median la remodelación continua del complejo SCF, que sufre ciclos de nedilación, denedilación por CSN, secuestro por Cand1, nedilación, liberación de Cand1 y formación del nuevo complejo SCF activo. Este ciclo permite el correcto funcionamiento de la E3 ligasa de Ub.

c) Inhibición de la nedilación

El fármaco MLN4924 (también llamado Pevonedistat, de Millennium Pharmaceuticals, Inc. Takeda Oncology Company, Cambridge, MA, USA) inhibe la nedilación a nivel de la E1 (NAE) (Soucy, Smith et al. 2009) y ha sido ampliamente usado para la inhibición general de los complejos CRLs (Soucy, Dick et al. 2010; Nawrocki, Griffin et al. 2012; Zhao and Sun 2013; Zhao, Morgan et al. 2014). Durante el proceso de nedilación en presencia de MLN4924, aunque la NAE lleva a cabo el primer paso de adenilación de Nedd8, dependiente de ATP, debido a la similitud del MLN4924 con la molécula de AMP, se forma un aducto entre Nedd8 y MLN4924. Este aducto es similar al Nedd8 adenilado que debería formarse en condiciones normales, pero con la

diferencia de que permanece adherido al centro activo de la NAE (figura 15) bloqueando la actividad de la enzima e impidiendo que continúe el proceso de nedilación (mostrado en la figura 14) (Brownell, Sintchak et al. 2010). De este modo se bloquea de manera específica la nedilación de los complejos CRL (Soucy, Smith et al. 2009). La degradación de numerosos reguladores del ciclo celular depende de la nedilación y activación de los complejos CRL (Frescas and Pagano 2008), es por ello que MLN4924 ha mostrado tener propiedades antitumorales y actualmente se están llevando a cabo los primeros ensayos clínicos con esta molécula (Soucy, Smith et al. 2009; Soucy, Smith et al. 2009; Nawrocki, Griffin et al. 2012; Bulatov and Ciulli 2015; Bhatia, Pavlick et al. 2016; Paiva, Godbersen et al. 2017; Picco, Petti et al. 2017; Wong, Micel et al. 2017).

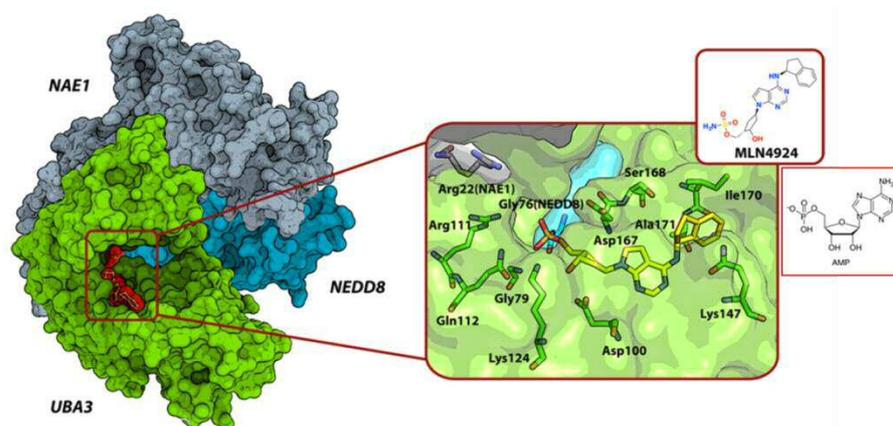


Figura 15. Reconstrucción tridimensional de la interacción entre NAE1, NEDD8 y UBA3: Se destaca el sitio de unión de MLN (en rojo). Debido a su similitud con la molécula de AMP, MLN interfiere con la reacción de transferencia de NEDD8 desde NAE1 (E1) a UBA3 (E2), necesaria para que se lleve a cabo el primer paso de la reacción. Modificado a partir de (Bulatov and Ciulli 2015)

d) Regulación de SCF por dimerización de sus proteínas F-box

Otro mecanismo de regulación del complejo SCF depende de su capacidad para formar dímeros a través de sus proteínas F-box (Tang, Orlicky et al. 2007;

Merlet, Burger et al. 2009) (figura 16). Esto favorece el encuentro de la E3 con el sustrato y la enzima E2-Ub cuando la disponibilidad local de los mismos es baja. También puede facilitar el reconocimiento del sustrato al modificar la orientación de las lisinas del mismo que aceptarán la ubiquitina de la E2 y así puede adaptar a todo el complejo al tamaño y forma del sustrato.

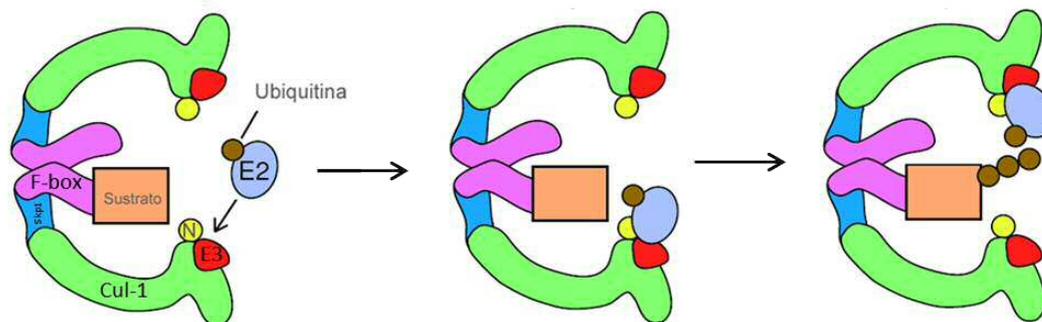


Figura 16: Regulación de la actividad de SCF por dimerización de sus proteínas F-box: En situaciones en las que la disponibilidad del sustrato y la E2 cargada sean limitados, se puede producir la dimerización de complejos E3-ligasa a través de sus subunidades F-box permitiendo la ubiquitinación de un sustrato en un SCF por parte de otro SCF que presente la E2 cargada con ubiquitina. Modificado a partir de (Bosu and Kipreos 2008).

Además, otro mecanismo regulador parece ser la existencia de “pseudosustratos” que pueden unirse a SCF, pero no son ubiquitinados. Se desconoce la función de estas proteínas pero se cree pueden desempeñar un papel regulador de la ubiquitinación compitiendo por afinidad con los sustratos del complejo SCF (Davis, Hatzubai et al. 2002).

6.5 Principales dianas conocidas del complejo SCF

Las proteínas F-box, la subunidad del complejo E3 ligasa que reconoce al sustrato, confieren especificidad al proceso de ubiquitinación. De las 69 proteínas F-box conocidas, sólo se han identificado los sustratos de unas 20 F-box (Frescas

and Pagano 2008; Zheng, Zhou et al. 2016). Los siguientes ejemplos son algunas F-box que interaccionan con Cul-1 dentro de SCF y algunos de los sustratos que reconocen:

- **SKP2:** reconoce para su ubiquitinación y, degradación, algunos reguladores negativos del ciclo celular, como p27, p21 y p57, otras proteínas supresoras de tumores como RBL2 y FOXO1. SKP2 reconoce a estos sustratos cuando se encuentran fosforilados en secuencias específicas (Frescas and Pagano 2008; Ravid and Hochstrasser 2008).
- **Fbw7:** induce la ubiquitinación de reguladores positivos del ciclo celular, como Myc, Jun, la Ciclina E, Notch, Presenilina 1/2 y SREBP1/2 (Welcker and Clurman 2008).
- **β TRCP:** reconoce a una gran variedad de sustratos como β -Catenina, I κ B α , p100, IFN α R, SNAIL, y STAT1, y también a algunos reguladores del ciclo celular como Wee1, Emi1/2 y Cdc25A/B (Frescas and Pagano 2008).

6.6 El proteasoma 26s

El proteasoma 26S es una compleja maquinaria de proteólisis de 2.5 MDa encargada de la degradación de proteínas marcadas con cadenas de ubiquitina (Hershko and Ciechanover 1998; Murata, Yashiroda et al. 2009; Tanaka 2009; Inobe and Matouschek 2014). Se encarga de la degradación de toda clase de proteínas, desde proteínas reguladoras a estructurales, y también de la eliminación de proteínas defectuosas o desnaturalizadas que podrían interferir con el correcto funcionamiento de la célula (Hershko, Eytan et al. 1982).

Al proteosoma se le han atribuido, a su vez, funciones inmunológicas debido a que lleva a cabo el procesamiento de péptidos antigénicos para su presentación en moléculas del CMH (Kloetzel 2004). Por todo ello, el proteasoma participa en la homeostasis, la regulación del ciclo celular y la apoptosis, la diferenciación, la respuesta inmunológica y el metabolismo celular (Glutzer, Murray et al. 1991; Hershko, Ganoth et al. 1991; Kloetzel 2004; von Mikecz 2006; Konstantinova, Tsimokha et al. 2008) .

Este macrocomplejo está dividido estructuralmente y funcionalmente en dos subcomplejos (**figura 17**): un núcleo central catalítico 20S y una o dos partículas reguladoras 19S en los extremos, que se denominan así por su coeficiente de sedimentación. Cada subcomplejo está formado por anillos compuestos por múltiples subunidades que desempeñan distintas funciones durante el proceso de degradación. El proteasoma 19S está encargado del reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas y de su desdoblamiento para penetrar en el proteasoma 20S, que posee la actividad proteolítica.

El **proteasoma 20S** está formado por 4 anillos apilados, dos interiores tipo β y dos exteriores tipo α , que forman una estructura de barril con un túnel central. Cada anillo está formado por 7 subunidades (α 1-7, β 1-7). Los anillos tipo β poseen las subunidades con actividad catalítica, β 1, β 2 y β 5, cuyo extremo N-terminal, con capacidad hidrolítica, está orientado hacia el interior del túnel (Arendt and Hochstrasser 1997; Heinemeyer, Ramos et al. 2004). β 1 posee actividad similar a caspasa, permitiendo el corte de la proteína a través de aminoácidos ácidos de su C-terminal. β 2 posee actividad similar a tripsina al

cortar las proteínas por sus aminoácidos básicos en el extremo C-terminal. Y $\beta 5$ posee actividad similar a quimotripsina y permite cortar a las proteínas por sus residuos hidrofóbicos (Arendt and Hochstrasser 1997; Heinemeyer, Ramos et al. 2004; Murata, Yashiroda et al. 2009; Tanaka 2009). Los anillos periféricos α tienen una función reguladora sobre los anillos β puesto que los extremos N-terminal de las subunidades α pueden cerrarse y ocluir el paso hacia el túnel formado por los anillos β (Tanaka 2009). El mecanismo de apertura de las subunidades α no ha sido completamente elucidado, pero probablemente esté regulado por el proteasoma 19S. El núcleo catalítico 20S degrada las proteínas a oligopéptidos de entre 3 y 15 aminoácidos, que son posteriormente degradados a aminoácidos simples por oligopeptidasas y/o amino-carboxi peptidasas.

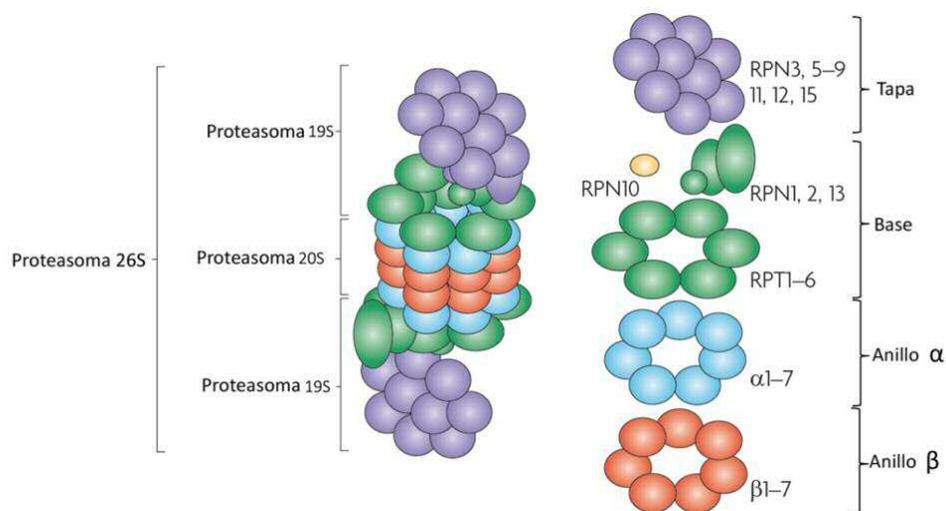


Figura 17. Estructura del proteasoma 26S. El proteasoma 26S está formado por un núcleo catalítico o proteasoma 20S compuesto por dos anillos α exteriores y dos anillos β internos, con actividad proteasa, y una partícula reguladora o proteasoma 19S en cada extremo del 20S, formado por una tapa y una base. El proteasoma 19S está compuesto por partículas reguladoras con capacidad ATPasa (RPT) y otras sin capacidad ATP-asa (RPN). Modificado a partir de (Murata, Yashiroda et al. 2009).

El **proteasoma 19S** es una unidad reguladora que cubre uno o ambos extremos del proteasoma 20S. Está formado por al menos 19 subunidades distintas denominadas partículas reguladoras (regulatory particles o RP) agrupadas en dos partes, una tapa y una base, que interacciona directamente con el núcleo catalítico 20S (Murata, Yashiroda et al. 2009). La degradación de proteínas por el proteasoma conlleva un gasto de ATP, por ello el proteasoma 19S está formado por algunas subunidades reguladoras con actividad ATPasa, RPT (regulatory particle of triple-ATPase), y otras subunidades sin capacidad ATPasa, RPN (regulatory particle non-ATPase). La **tapa** está compuesta por las subunidades encargadas del reconocimiento del sustrato poliubiquitinado y de la deubiquitinación del mismo, que libera a la proteína para ser degradada y a las ubiquitininas para ser recicladas. Se ha demostrado que la unión de proteínas poliubiquitinadas estimula la actividad del proteasoma (Bech-Otschir, Helfrich et al. 2009; Li and Demartino 2009; Peth, Besche et al. 2009). La **base** está formada por 6 RPT y 4 RPN que están encargadas del desdoblamiento de la proteína, la apertura del canal α del proteasoma 20S y la traslocación de la proteína hacia el interior del mismo.

6.7 El sistema UPS en patología

El proteasoma 26S se localiza tanto en el citoplasma, ya sea independiente o asociado al retículo endoplasmático, como en el núcleo de las células eucariotas (Wojcik and DeMartino 2003; von Mikecz 2006). En este sentido, se ha sugerido que el correcto funcionamiento del proteasoma en el núcleo de las células es necesario para que se mantenga la proteostasis nuclear (homeostasis de proteínas

nucleares), puesto que la acumulación de proteínas aberrantes en el núcleo puede dar lugar a numerosas patologías neurodegenerativas (Gallagher, Oeser et al. 2014).

Como se ha mencionado, el sistema ubiquitina proteasoma regula múltiples procesos, con lo que un incorrecto funcionamiento del mismo puede dar lugar a patologías muy diversas, como el cáncer, patologías neurodegenerativas y patologías autoinmunes (Paul 2008). Es por ello que se han desarrollado inhibidores del proteasoma, como el Bortezomib (Paramore and Frantz 2003), que actualmente se utiliza para tratar el mieloma múltiple, la Lactacistina (Omura, Fujimoto et al. 1991) o el MG132, actualmente el más utilizado en investigación y que ha mostrado tener también propiedades antitumorales (Han and Park 2010; Guo and Peng 2013; Qiang, Sui et al. 2017).

Sin embargo, estos inhibidores actúan de manera inespecífica sobre la degradación de proteínas, y muchas patologías ya descritas se han asociado a disfunciones en ligasas E3, que llevan a la acumulación de proteínas como p53 o la ciclina E (Strohmaier, Spruck et al. 2001; Sakamoto 2002; Staropoli, McDermott et al. 2003). Es por ello que un abordaje más específico, como la inhibición de los complejos CRLs por parte el MLN4924 ha mostrado tener muy buenos resultados en cáncer (Soucy, Smith et al. 2009; Nawrocki, Griffin et al. 2012; Bulatov and Ciulli 2015; Bhatia, Pavlick et al. 2016; Paiva, Godbersen et al. 2017; Picco, Petti et al. 2017) o la enfermedad inflamatoria intestinal (Cheng, Hu et al. 2016). Sin embargo, es importante conocer cómo estos tratamientos

afectan al sistema inmunológico, fundamental para la resolución de las enfermedades.

Algunos estudios han destacado que la nedilación juega un papel crucial en el funcionamiento de algunas células del sistema inmunológico, como macrófagos, células T y CD_s. Por ejemplo, la inhibición de la nedilación reprime la liberación de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS en macrófagos (Chang, Reyna et al. 2012), e inducida por la activación del TCR en células T (Jin, Liao et al. 2013). Esto también ocurre en las CD_s, humanas y murinas, donde la inhibición de la nedilación o la inactivación de SCF resulta en la supresión de la liberación de citoquinas proinflamatorias dependiente de LPS y otros estímulos, tanto infecciosos (ligandos de TLR1/2 y NOD2) y como no infecciosos (agonistas CD40L) (Mathewson, Toubai et al. 2013; Cheng, Hu et al. 2016). Además, también se ha demostrado que la inhibición de la nedilación en CD_s inhibe su capacidad de estimular a las células T alogénicas para que éstas proliferen (Mathewson, Toubai et al. 2013; Cheng, Hu et al. 2016).

ANTECEDENTES

CCR7 regula una compleja red de señalización que le permite controlar múltiples funciones homeostáticas en las células dendríticas (CDs), incluyendo la quimiotaxis, supervivencia, velocidad migratoria, citoarquitectura, endocitosis o maduración (Yanagawa and Onoe 2002; Yanagawa and Onoe 2003; Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Marsland, Battig et al. 2005; Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005; Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2006; Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015; Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015). La mayoría de los estudios sobre CCR7, y de los receptores de quimioquinas en general, se han centrado en el análisis del papel regulador de la fosforilación en el control de las funciones celulares mencionadas, pero los estudios de otros tipos de modificaciones post-traduccionales que pudieran ser importantes para la regulación de las funciones conocidas, u otras funciones desconocidas, de este receptor son escasos (Schaeuble, Hauser et al. 2012).

La nedilación, o unión de Nedd8 a una proteína, es un tipo de modificación post-traducciona que está involucrada en el control de algunas funciones de leucocitos del sistema inmune innato (Chang, Reyna et al. 2012; Li, Liu et al. 2013; Mathewson, Toubai et al. 2013; Cheng, Hu et al. 2016), y del sistema inmune adaptativo (Jin, Liao et al. 2013). La función más estudiada de la nedilación es la activación de las ligasas E3 de ubiquitina tipo CRL, entre ellas, la más estudiada es SCF (CRL-1) (Merlet, Burger et al. 2009).

La E3 ubiquitin ligasa SCF (Skp1-Cullin-1-F-Box) controla la ubiquitación de una gran cantidad de proteínas celulares para su degradación por el proteasoma y SCF se activa cuando su componente Cul-1 se nedila (Merlet, Burger et al. 2009). Por tanto, la nedilación regula la actividad E3 ubiquitin ligasa y la ubiquitinación de componentes celulares.

HIPÓTESIS

CCR7 controla en las células dendríticas humanas la ubiquitinación de proteínas mediante la estimulación, a través de nedilación, de la actividad de la ubiquitin-ligasa SCF (Skp1-Cullin1-F-Box).

OBJETIVOS

1. Analizar si la estimulación de CCR7 induce nedilación de Cullin-1 (Cul-1) en CDs humanas maduras y e identificar las proteínas G señalizadoras que median la nedilación de Cul-1.
2. Analizar si se requiere nedilación para el control de las funciones reguladas por CCR7 (quimiotaxis, supervivencia, velocidad migratoria, endocitosis y cambios en citoarquitectura).
3. Analizar la localización subcelular de Cullin nedilado (Cul-1^{Nedd8}).
4. Estudiar si Cul-1^{Nedd8} forma parte del complejo SCF (Skp1-Cul-1-F-Box).
5. Estudiar si la nedilación de SCF, y la consecuente activación de esta ligasa, regula la ubiquitinación de proteínas en las CDs.
6. Analizar las proteínas que son ubiquitinadas por SCF tras la estimulación de CCR7.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos generales

Las quimioquinas CCL19, CCL21 y el TNF se adquirieron a PeproTech (Rocky Hill, NJ). Las citoquinas recombinantes humanas IL-4 y GM-CSF se obtuvieron de Immunotools.

El Ficoll (Lymphoprep) se obtuvo de Axis Shield (Oslo, Noruega). Los monocitos se purificaron con anticuerpos anti-CD14 unidos a bolitas magnéticas (Miltenyi Biotec, STEMCELL Technologies, GR, Francia).

El inhibidor MLN4924 se obtuvo de Active Biochemicals Co. (Wan Chai, Hong Kong.). El dextrano-FITC, la poli-L-ornitina, el Hoechst 33258, el colorante rojo Ponceau, la toxina pertúsica, el cocktail de inhibidores de proteasas, la Faloidina-TRITC y el kit de PLA Duolink fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania). La pepstatina A, la albúmina de suero bovino (BSA) y los anticuerpos secundarios de conejo, ratón y cabra acoplados a la peroxidasa (HRP) se adquirieron a Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA).

Los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos, anti-rabbit Alexa 568, anti-mouse Alexa 488 y anti-goat Alexa 488 se adquirieron a Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

La información sobre los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis se detalla en la siguiente tabla.

Anticuerpo	Casa comercial	Especie	Concentración	Técnica	Concentración	Técnica	Concentración	Técnica
Actina β	Santa Cruz	Ms	0,2 μ g/ml	WB				
AKT p-Ser473	Cell Signalling	Rb	1 μ g/ml	WB				
AKT p-Thr308	Cell Signalling	Rb	1 μ g/ml	WB				
Cofilina p-Ser3	Santa Cruz	Rb	0,2 μ g/ml	WB				
Cullin-1	Biorbyt	Rb	1 μ g/ml	WB	10 μ g/ml	IF		
Cullin-1	Santa Cruz	Rb	2 μ g/ml	IP	4 μ g/ml	IF		
CD3 ζ	Santa Cruz	Ms	2 μ g/ml	IP				
ERK1	Santa Cruz	Rb	0,2 μ g/ml	WB				
ERK2	Santa Cruz	Rb	0,2 μ g/ml	WB				
ERK1/2 p-Thr202/p-Tyr204	Cell Signalling	Rb	1 μ g/ml	WB				
Prot G β 2	Santa Cruz	Rb	0,2 μ g/ml	IP				
I κ B α	Biorbyt	Rb	1 μ g/ml	WB				
Lamina- β 1	Cell Signalling	Rb	1 μ g/ml	WB				
LAT	Santa Cruz	Rb	10 μ g/ml	IP				
LDH	Sigma	Ms	1 μ g/ml	WB				
Nedd8	Cell Signalling	Rb	1 μ g/ml	WB	20 μ g/ml	IF		
Nedd8	Genetex	Rb	1 μ g/ml	WB	40 μ g/ml	IF		
PKC ζ	Santa Cruz	Gt	10 μ g/ml	IP				
p65 (NF κ B)	Santa Cruz	Rb	0,2 μ g/ml	WB				
Rbx1	Santa Cruz	Ms	0,2 μ g/ml	WB	2 μ g/ml	IF		
Rbx1	Biorbyt	Rb	1 μ g/ml	WB				
Rho-GDI	Santa Cruz	Rb	0,2 μ g/ml	WB				
Skp1	Santa Cruz	Gt	0,2 μ g/ml	WB	10 μ g/ml	IP		
Skp1	Cell Signalling	Rb	1 μ g/ml	WB				
Tubulina α	Rockland	Rb	1 μ g/ml	WB				
Ubiquitina	Santa Cruz	Ms	4 μ g/ml	IF	2 μ g/ml	IP	0,2 μ g/ml	WB
Ubiquitina K48	Millipore	Rb	1 μ g/ml	WB				
Vinculina	Sigma	Ms	2,5 μ g/ml	WB				
Proteasoma 20S β 2	Santa Cruz	Gt	0,2 μ g/ml	WB	4 μ g/ml	IF		

Tabla 1: información de los anticuerpos utilizados en esta tesis y las concentraciones y técnicas para las que se usaron. Rb = conejo, Ms = ratón, Gt = cabra. WB = Western Blot, IP = inmunoprecipitación, IF = inmunofluorescencia.

Modelo experimental

Se utilizaron células dendríticas (CDs) humanas derivadas de monocitos de sangre periférica, obtenida de donantes sanos a través del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. La sangre, obtenida en forma de concentrado leucoplaquetario, se diluyó en PBS para luego separar sus distintos componentes mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. De este modo se separó la fracción de células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood

Mononuclear Cells, PBMCs), que contiene mayormente monocitos, linfocitos T y B y células NK. A continuación, se purificaron los monocitos (células CD14+) mediante la utilización de anticuerpos anti-CD14 acoplados a bolitas magnéticas y un soporte imantado, siguiendo las instrucciones del proveedor (Miltenyi Biotech). Las células obtenidas, monocitos CD14+ (95%), se resuspendieron en RPMI con 10% de suero fetal bovino (FBS, Fetal Bovine Serum, Lonza Group Ltd, Basilea, Suiza) y se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en presencia de las citoquinas GM-CSF (1000 U/ml) y IL-4 (1000 U/ml). Las citoquinas, que se suministraron cada 2 días a partir del inicio del cultivo y durante 7 días, inducen la diferenciación de los monocitos hacia un fenotipo de CD inmadura. Las CDs inmaduras se maduraron añadiendo, además de las citoquinas GM-CSF e IL-4 a las concentraciones indicadas, la citoquina pro-inflamatoria TNF- α (50 ng/ml). Tras 3 días en cultivo, se obtuvo un porcentaje de células CD80+, CD86+, CD83+, CCR7+ y HLA-DR+ mayor del 85%. Estas células además dejaron de expresar CD14 (menos de 1% de células CD3+, CD14+, CD16+ o CD19+). Por tanto, las CDs maduras se utilizaron para los experimentos en el día 10 y 11 desde el momento de su purificación.

Experimentos de estimulación de CCR7

Para los experimentos se utilizaron las CDs maduras, que expresan el receptor CCR7. Para estudiar el efecto que ejerce la estimulación de CCR7 sobre la dinámica de activación de diferentes moléculas de señalización intracelular, se estimularon las CDs maduras con CCL21 a distintos tiempos. En primer lugar, es necesario reducir la actividad basal de las moléculas a estudiar. Por ello, las

células (10^6 células/ml) se trasladaron a un medio RPMI sin suero que incluye 0,1% de BSA, donde se dejaron aclimatar entre 30 y 45 minutos a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente, las CDs se estimularon con CCL21 (18 nM) y se mantuvieron en el incubador durante tiempo indicado en la leyenda de las figuras. A continuación, las células se centrifugaron a las máximas revoluciones (~ 12.000 g) durante 30 segundos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y los pellets obtenidos se lisaron resuspendiéndolos en buffer de carga (SB) 2x (200 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0,1 mM de ortovanadato sódico, 6% SDS, 1 mM EDTA, 4% β -mercaptoetanol, 10% glicerol y azul de bromofenol). Las muestras obtenidas se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y, posteriormente, se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

Experimentos con inhibidores

Se realizaron diversos experimentos en los que se bloqueó una determinada proteína o ruta de señalización. Los experimentos de inhibición se realizaron del mismo modo que los experimentos de estimulación mencionados arriba, solo que las células se incubaron con los inhibidores farmacológicos de interés, en ausencia de suero y a los tiempos indicados en la leyenda de las figuras, antes de la estimulación con CCL21.

Western Blot

Las muestras obtenidas de los experimentos se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).

Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (previamente activadas con metanol) mediante un sistema de transferencia húmedo. Tras la transferencia, se realizó una tinción de la membrana con rojo Ponceau para comprobar que la transferencia se había producido correctamente. Las membranas teñidas fueron escaneadas para conservar información sobre la carga de las proteínas. Tras ser desteñidas, las membranas se bloquearon durante 1h en TBST (TBS 0,1% Tween 20, pH 7,5) que incluye 5% de leche desnatada en polvo. Después, las membranas se incubaron durante 18 h a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla 1) en TBST+ 5% BSA. Tras esta incubación, se realizaron 3 lavados con TBST y las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios frente a la especie de interés (conejo, ratón, cabra) acoplado a peroxidasa (80 ng/ml en TBST) durante 1h. Por último, se lavaron 3 veces más con TBST y se procedió al revelado digital (Chemidoc, Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU) o analógico (Curix 60, Agfa-Gevaert Group) de las bandas inmunoreactivas con ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

El densitometrado de las bandas se realizó con los softwares Multigauge de Fujifilm, Image Lab de Bio-rad e Image J, corrigiéndose los valores de las proteínas frente a un control de carga y normalizándolos respecto al punto no estimulado con CCL21, también llamado tiempo 0 ó (-), y frente al control sin tratar, en caso de tratamiento con inhibidores.

Para la eliminación de anticuerpos primarios y reincubación de membranas con nuevos anticuerpos, procedimiento conocido como “*stripping*” se utilizó un buffer compuesto por glicina (125 mM), 0,1% SDS, 1% Tween 20 pH 2.2. La

membrana se sometió a 2 lavados de 10 min en el buffer de stripping, después 2 lavados de 10min en PBS, 2 lavados de 5 min en TBST y fue bloqueada de nuevo e incubada con los anticuerpos primarios como se ha mencionado anteriormente.

Inmunofluorescencias

Las CD_s maduras se resuspendieron en RPMI 0,1% BSA a una concentración de 10⁶ CD_s/ml. A continuación, se sembraron 5x10⁵ células en cristales de 10 mm de diámetro que habían sido previamente cubiertos con poli-L-ornitina (0,1 mg/ml) y se dejaron adherir durante 1h a 37°C. Tras la estimulación con CCL21 (18 nM) las células se fijaron con PFA 4% (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) durante 15 min a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS, las células se permeabilizaron con metanol frío o Tritón X-100 al 0,2% en PBS durante 5 min. Tras otros 3 lavados con PBS, las preparaciones se bloquearon con IgG humana (1 µg/ml) durante 5 min. A partir de este momento, los lavados se hicieron con PBS 0,1% BSA. Las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS 0,1% BSA durante 1h. Se hicieron 3 lavados y después se añadió la mezcla de anticuerpos secundarios diluidos en PBS 0,1% BSA junto con el colorante Hoechst 33258 durante 1h. Las muestras se lavaron 2 veces con PBS y 1 vez con agua destilada antes de ser montadas sobre portaobjetos con el medio de montaje Dako (Dakocytomation). Finalmente se analizaron con un Microscopio Láser Confocal espectral (CLSM) Leica TCS SP5. Se realizaron entre 10 y 20 fotografías de secciones confocales de 0,5 µm de grosor. Las imágenes se analizaron con el software de Leica LAS X y con Image J, con el que se realizaron

las animaciones en 3D. Las imágenes fueron preparadas con el software Adobe Photoshop CS.

Ensayo de ligación por proximidad: PLA (Proximity Ligation Assay)

La técnica del PLA permite analizar mediante microscopía de fluorescencia la proximidad de dos moléculas (Fredriksson, Gullberg et al. 2002; Soderberg, Gullberg et al. 2006). Con esta técnica se obtiene una señal fluorescente positiva cuando las dos moléculas analizadas se encuentran a una distancia menor a 40 nm, distancia a la cual la probabilidad de que estén interaccionando es muy alta.

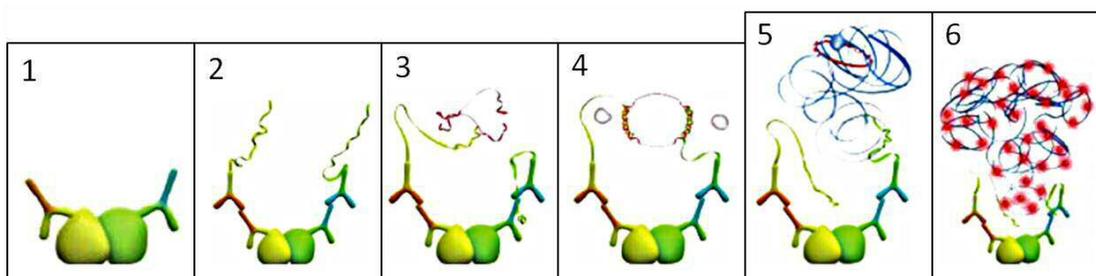


Figura 18: La técnica PLA consiste en el marcaje de las proteínas cuya interacción quiere detectarse con sus respectivos anticuerpos primarios (1). A continuación, se añaden los anticuerpos secundarios que llevan acopladas unas sondas de ADN (2). Se añaden unas sondas complementarias y conectoras (3) y una ligasa de ADN, que produce la ligación de las sondas y la formación de un ADN circular (4). Se añade una ADN-polimerasa que amplifica el ADN circular (5) y gracias a la presencia de oligonucleótidos marcados fluorescentemente (6) se puede observar una señal fluorescente al microscopio, siempre y cuando las proteínas analizadas se encuentren a menos de 40 nm para que las sondas acopladas a sus anticuerpos secundarios puedan hibridar. (Modificado del catálogo de Sigma).

Las CDs (5×10^4 células) se dejaron adherir sobre cristales cubiertos previamente de poli-L-ornitina y se fijaron del mismo modo que se hizo para las inmunofluorescencias. Las muestras se permeabilizaron con 0,2% Triton x100 ó metanol frío (Panreac), se bloquearon con IgG humana y se incubaron con los anticuerpos primarios. A continuación, en lugar de utilizarse anticuerpos secundarios, se llevó a cabo el PLA (figura 18), siguiendo las instrucciones del

fabricante (Duolink II in situ PLA detection kit, Sigma). Las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios especiales conjugados con unas sondas de ADN (sondas PLUS y MINUS) que hibridan y generan un ADN circular gracias a una enzima ligasa y a oligos complementarios. Seguidamente, se lleva a cabo una amplificación del ADN circular mediante la adición de la enzima polimerasa. Finalmente se añadieron sondas de oligonucleótidos complementarios fluorescentes que se unen al ADN amplificado. Por último, las muestras se montaron con un medio que incluye el colorante DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) para el marcaje de los núcleos. La amplificación del ADN circular, indicativa de una señal positiva de PLA, se aprecia como un punteado fluorescente en las zonas donde las moléculas estudiadas se encuentran próximas entre sí. Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal, del mismo modo que las inmunofluorescencias.

Fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares

Para el fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares se utilizaron 5×10^6 CDs maduras por condición. Se llevó a cabo el experimento en RPMI 0,1% BSA y, al finalizar el mismo, las células se lavaron con PBS frío, manteniéndose en medio frío (4°) a partir de este momento. Las CDs se disolvieron en buffer de extracción de proteínas citoplásmicas (10 mM Hepes pH 7,6, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM molibdato) suplementado con los inhibidores de proteasas: pepstatina A (10 µg/ml) y el cocktail de inhibidores Sigma (5 mg/ml), que incluye EDTA (1 mM), AEBSF (2 mM), Bestatin (130 µM), E64 (14 µM), Leupeptin (1 µM). Las células se incubaron en hielo durante 15 min

y posteriormente se añadió NP-40 (Fluka, Sigma-Aldrich) al 10% y se agitó en un aparato vortex 5 segundos. Los lisados se centrifugaron a las máximas revoluciones (~12.000 g) durante 5 min a 4°C. Se separó el sobrenadante, que corresponde a la fracción citoplásmica, y se alicuotó y congeló a -80°C. Los *pellets* (núcleos) se lavaron con PBS, se resuspendieron en buffer de extracción de proteínas nucleares (20 mM Hepes pH 7,6, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM molibdato, pepstatina A (10 µg/ml) y el cocktail de inhibidor de proteasas de Sigma) y a continuación se incubaron 30 min en hielo, agitando con el vortex cada 10 min. Los lisados se centrifugaron a máximas revoluciones (~12.000 g) durante 30 min y se transfirieron los sobrenadantes (fracción nuclear) a un tubo nuevo. Se alicuotaron y congelaron las muestras a -80°C hasta su utilización.

La concentración proteica de los extractos citoplásmicos y nucleares se cuantificó mediante el método de Bradford utilizando el reactivo de la compañía Sigma. Tras la cuantificación se prepararon diluciones de las muestras a 2 mg/ml y se resuspendieron en buffer de carga 2x para ser analizadas por electroforesis (cargaron 15 µg de proteína por pocillo) y Western blot.

Inmunoprecipitaciones

Para estos ensayos se utilizó la mayor cantidad de CDs disponible (idealmente entre $15-30 \times 10^6$ células, equivalente a 2-4 mg de proteína total). Las células se resuspendieron en RPMI con 0,1% BSA y se dejaron estabilizar 45 min a 37° y 5% de CO₂. Posteriormente las células se estimularon con CCL21 durante 5 min,

tras lo cual se lavaron con PBS frío para detener la reacción. Las células se mantuvieron a 4°C el resto del proceso. A continuación, las CDs se lisaron en un buffer de inmunoprecipitación (1% NP-40, 50 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% glicerol y cocktail de inhibidores de proteasas de Sigma (5 mg/ml)) y se incubaron con rotación durante 1 h. El lisado fue sonicado 5 min y centrifugado a ~12.000 g durante 90 min. Posteriormente, el sobrenadante se sometió a un pre-aclarado con agarosa unida a proteína A durante 18 h en rotación a 4°C. Tras eliminarse por centrifugación la proteína A-agarosa, se añadieron los anticuerpos (2 µg/mg de proteína) y se incubaron durante 6 h. Después se incubó el lisado con 30 µl/ml de proteína A-agarosa durante 1h. Se recogió el *pellet* de agarosa, y, tras varios lavados, las muestras estuvieron listas para ser procesadas, bien mediante Western blot, resuspendiéndolas en buffer de carga 2x, o bien para su análisis por proteómica.

Inmunoprecipitación nuclear

En este trabajo se llevó a cabo, también, la inmunoprecipitación de proteínas nucleares. Para ello se realizó la extracción de proteínas como se mencionó en el método de fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares. Tras la separación de los extractos citoplásmicos, se lavaron los pellets nucleares 3 veces con PBS frío. Estos pellets se disolvieron en el buffer de inmunoprecipitación mencionado arriba, se sonicaron durante 5 min y se procedió con la inmunoprecipitación de la manera habitual. Una vez terminado el proceso, las muestras se procesaron para ser analizadas mediante Western blot o mediante proteómica.

Análisis proteómico

Las muestras obtenidas en la inmunoprecipitación nuclear fueron sometidas a un proceso de digestión con tripsina para obtenerse los péptidos que posteriormente se analizaron mediante cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas (MS).

Digestión con tripsina

Las muestras se resuspendieron en 50 mM de bicarbonato amónico pH 8.0, y se trataron con 1 µg de tripsina, manteniéndose durante 18 h a 37 °C con agitación (700 rpm). Al final de este período se añadieron 0,5 µg de tripsina y se continuó la incubación durante otras 2 h en las mismas condiciones. Posteriormente las muestras se centrifugaron, y los péptidos trípticos (el sobrenadante) se pasaron a un tubo limpio. El *pellet* se lavó dos veces con 100 µL de agua de calidad HPLC, El sobrenadante resultante de los dos lavados se juntó con los péptidos recolectados anteriormente, y el *pellet* se desechó. La solución con péptidos se acidificó con 50% de ácido fórmico (FA) hasta tener una concentración final de FA del 2%. Las muestras se secaron en el concentrador de vacío SpeddVac (Eppendorf), se resuspendieron en 20 µL de FA al 5% y una tercera parte de las muestras se analizó en el espectrómetro de masas Q-Exactive.

Análisis LC-MS

Los péptidos se cargaron en una pre-columna Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific) y se eluyeron en una columna PepMap RSLC C18, de 15 cm de

longitud, 75 μm de diámetro interno y 3 μm de tamaño de partícula (Thermo Scientific). La separación de los péptidos se llevó a cabo en un nano Easy nLC 1000 (Proxeon) acoplado a una fuente iónica con nanoelectrospray (Thermo Scientific).

La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 300 nL/min usando 0.1% de ácido fórmico en agua (tampón A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (tampón B). Se siguió un perfil de gradiente de 0–35% de tampón B durante 90 min, 35%-100% de tampón B durante 4 min y 100% de tampón B durante 8 min.

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Q Exactive (Thermo Scientific) trabajando en modo positivo. Los espectros de masas correspondientes al espectro de barrido completo tenían una relación de masa carga (m/z) 400-1500 Th y se obtuvieron con una resolución de 70.000 y 36.000, respectivamente. De cada espectro se seleccionaron los 10 iones más intensos para su fragmentación mediante disociación por colisión de alta energía (HCD). Los iones con carga única o sin asignación de carga se desecharon. La ventana de exclusión dinámica se fijó en 20 s. Los archivos de espectros (*.raw) se enfrentaron a la base de datos *Homo sapiens* a través de Proteome Discoverer (versión 1.4.1.14, Thermo Scientific) utilizando MASCOT como motor de búsqueda. En los parámetros de búsqueda, la carbamidometilación de cisteínas y la oxidación de metionina se establecieron como modificaciones fijas. La tolerancia de la selección de los precursores y los iones producto se fijó en 10 ppm y 0,02 Da, respectivamente. La identificación de los péptidos se validó mediante el algoritmo Percolator usando un valor $q \leq 0,01$ (1).

El conjunto de proteínas identificadas, excluyendo aquellas que se encontraron en el control de inmunoprecipitación, se filtraron contrastándose con la base de datos CRAPome (Mellacheruvu, Wright et al. 2013), un repositorio online de proteínas identificadas que aparecen recurrentemente en los controles negativos de experimentos de purificación por afinidad acoplados a espectrometría de masas (AP-MS) y, por tanto, muy probablemente sean contaminantes. Se eliminaron aquellas proteínas que aparecieran en más del 60% de los controles negativos de los experimentos del CRAPome.

Las proteínas resultantes del filtrado se introdujeron en la base de datos STRING (<http://string-db.org/>) (Szklarczyk, Franceschini et al. 2011), que recoge la información disponible acerca las interacciones conocidas o probables entre las proteínas y las agrupa de acuerdo a distintos parámetros formando redes. Este software detecta, entre otras características, posibles clusters de proteínas pertenecientes a la misma ruta de señalización, o que realizan funciones similares. Además, se analizó el enriquecimiento en procesos biológicos del conjunto de proteínas mediante el software FunRich 3.0, una herramienta bioinformática que aporta información sobre el enriquecimiento funcional y el análisis de las redes de interacción entre las proteínas identificadas.

Nucleofecciones

Las CDs se transfectaron con siRNA frente a Cul-1 (ON-TARGET plus human CUL1 (8454) siRNA - SMART Pool de Dharmacon, N° catálogo L-004086-00-0005) o siRNA control (ON-TARGET plus Non-targeting Pool, Dharmacon N°

catálogo D-001810-10-05), mediante el método de nucleofección (Amaxa, Lonza Group Ltd Basilea, Suiza) utilizando un kit específico para células dendríticas (Nucleofector™ Kits for Human Dendritic Cells, Amaxa, Lonza Group Ltd) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, se utilizaron 2 µg de siRNA para nucleofectar 5×10^6 de CDs maduras por condición. Se utilizó un aparato nucleofector (Amaxa, Lonza Group Ltd) utilizando el programa U2, que es específico para las CDs. Posteriormente, las células se cultivaron en un medio completo (+FBS) que incluye GM-CSF (1000U/ml) y IL-4 (1000U/ml) y se incubaron durante 48h a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, las células se recolectaron y contaron mediante exclusión de la tinción con Azul Tripán, para excluir a las CDs muertas. Para comprobar que se había producido el silenciamiento del gen con el siRNA, se analizaron los niveles de la proteína de interés mediante Western blot, como se ha descrito previamente.

Ensayos de quimiotaxis

Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en placas 6,5 mm con soportes permeables *Transwells* de 5 µm de diámetro de poro (Costar, Corning Incorporated, NY, EEUU). Se utilizaron 10^5 CDs disueltas en RPMI 0,1% BSA y se colocaron en la cámara superior permeable del pocillo. En el pocillo inferior, relleno con RPMI 0,1% BSA, se añadió CCL21 (18 nM). Se reservaron alícuotas de las células como controles o inputs del número de células de partida. La placa se incubó durante 2h a 37° y 5% de CO₂. Tras este tiempo se recogió el medio del pocillo inferior y se contó el número de células que habían migrado a la

cámara inferior mediante citometría de flujo, estableciendo un conteo durante 60 segundos.

Ensayos de endocitosis

Para analizar la endocitosis en las CD_s maduras se realizaron experimentos de captación de dextrano-FITC (1 mg/ml) y se analizó la incorporación de este reactivo mediante citometría de flujo. Para ello se utilizaron 3×10^5 CD_s por condición que se resuspendieron en RPMI 10% FBS y HEPES (20 mM). Para el experimento es necesario un control de absorción pasiva de dextrano-FITC, que consiste en mantener a las células con dextrano-FITC a 4° durante todo el experimento. Las muestras donde se valoró la endocitosis activa se incubaron con dextrano-FITC a 37° y 5% de CO₂ el tiempo deseado, en presencia o ausencia de CCL21 (18 nM). Posteriormente las células se centrifugaron a 4°C y se lavaron 5 veces con PBS 0,1% BSA frío. Por último, se resuspendieron en PBS frío para su análisis por citometría de flujo mediante un citómetro EPICS (Coulter Electronics) equipado con un láser de Argón que emite a una longitud de onda de 488 nm y recoge la fluorescencia del FITC con un filtro FL1 a 525 nm.

Análisis de la apoptosis

Para analizar la apoptosis de las CD_s humanas se realizaron experimentos en los que se indujo la apoptosis mediante la privación de suero en células sin tratar o pre-tratadas con el inhibidor MLN4924, y que fueron mantenidas en presencia o ausencia de la quimioquina CCL21 (18 nM). Para ello se utilizó el mismo número

de células vivas, cuantificadas mediante la exclusión del colorante azul Tripán, mantenidas el tiempo indicado a 37° y 5% de CO₂ en RPMI 0,1% BSA.

Tras el experimento, se valoró la apoptosis de las CDs analizando la morfología de sus núcleos mediante tinción con Hoechst y microscopía de fluorescencia. Para ello, las CDs se adhirieron 45 min sobre cristales recubiertos de poli-L-ornitina, se fijaron con PFA 4% durante 15 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con metanol frío durante 5 min. Las muestras se tiñeron con Hoechst 33258 en PBS con 0,1% BSA durante 5 min y se montaron con medio de montaje DAKO del mismo modo que las inmunofluorescencias.

Las preparaciones se analizaron usando un microscopio Axioplan Universal de Zeiss con una cámara CCD Digital Leica DFC 350 FX y un objetivo 63x de inmersión en aceite (Leica Microsystems, Mannheim). Se realizaron fotografías al azar de los núcleos de las CDs en distintos campos y se cuantificaron alrededor de 500 células de cada condición y donante, analizando el porcentaje de núcleos condensados (picnóticos) o fragmentados presentes en cada muestra.

Análisis de la citoarquitectura

Al igual que en las inmunofluorescencias, las CDs maduras se resuspendieron en RPMI 0,1% BSA a una concentración de 10⁶ CDs/ml. A continuación, se sembraron 5x10⁵ de estas células en cristales de 10 mm de diámetro previamente cubiertos con poli-L-ornitina y se dejaron adherir durante 1h a 37°C. Tras este tiempo las células se dejaron sin estimular o se estimularon con CCL21 (18 nM)

durante 10 min. Posteriormente las células se fijaron con PFA (4%) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) durante 15 min, a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,2% V/V) en PBS durante 5 min. Tras 3 lavados con PBS. Las muestras se incubaron con Faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich) junto con el colorante Hoechst 33258 durante 1 h. Se hicieron 3 lavados con PBS 0,1% BSA una vez con agua antes de montar los cristales sobre portaobjetos con el medio de montaje Dako (Dakocytomation) y se analizaron con un Microscopio Láser Confocal espectral (CLSM) Leica TCS SP5. Las imágenes se analizaron con el software Image J, con el que se analizó la morfología de las CDs maduras tras ser estimuladas con CCL21, a través de la medición de su diámetro mayor. Las imágenes fueron preparadas con el software Adobe Photoshop CS.

Análisis estadístico

Los datos representados en las gráficas muestran la media \pm el error estándar de la media de experimentos que se realizaron en, al menos, 3 donantes sanos independientes. La evaluación de la significancia estadística entre tratamientos se calculó utilizándose la prueba t de Student para muestras pareadas. En los casos en los que la desviación era muy elevada se empleó la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. En todos los casos, se consideraron significativos los p-valoros inferiores a 0,05. Como prueba complementaria también se analizaron los intervalos de confianza. “ns” indica diferencias no significativas entre dos tratamientos, mientras que “N” hace referencia al número de experimentos

independientes realizados, es decir, número de donantes independientes analizados.

RESULTADOS

1. La estimulación de CCR7 en las células dendríticas induce nedilación de Cullin-1 mediada por Gai.

En primer lugar, quisimos averiguar si la activación de CCR7 podía inducir nedilación en las células dendríticas (CDs). La nedilación se puede analizar mediante Western blot (WB) usando anticuerpos frente Nedd8.

En la [figura 19](#) se puede observar que, la estimulación de CCR7 con CCL21 durante 5 min produjo un incremento significativo en la nedilación (Nedd8) ([figura 19A](#)) de una proteína de un peso molecular de ~85 KDa. Este peso molecular es similar al de la proteína Cul-1, la diana de nedilación mayoritaria y mejor caracterizada en diferentes tipos celulares, incluyendo las CDs (Mathewson, Toubai et al. 2013; Enchev, Schulman et al. 2015; Cheng, Hu et al. 2016). La unión de Nedd8 a Cul-1 provoca un cambio de movilidad electroforética de esta proteína (“shift”) que permite observar una señal de doble banda en el WB frente a Cul-1, siendo la banda superior, Cul-1-nedilada (Cul-1^{Nedd8}) y la banda inferior, Cul-1 sin modificar. Tras someter la membrana anterior a un lavado (*stripping*, ver Material y Métodos), se reincubó con un anticuerpo frente a Cul-1 y se observó que la banda nedilada detectada previamente, correspondía con Cul-1^{Nedd8} ([figura 19A](#)).

Los experimentos de estimulación de las CDs con CCL21 a distintos tiempos confirmaron que se obtenía la máxima nedilación entre los 2 y los 10 min,

manteniéndose niveles altos de nedilación hasta, al menos, los 30 min después de la estimulación con CCL21 (figura 19B). Como el tiempo máximo de nedilación se alcanzó tras 5 min de estimulación CCL21, el resto de las estimulaciones se realizaron a este tiempo.

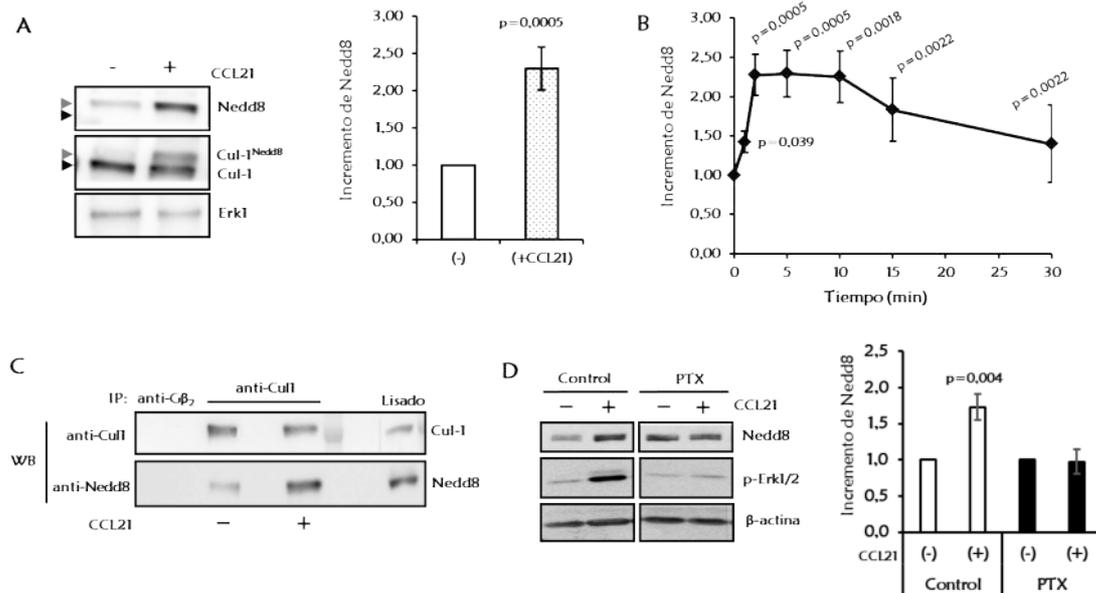


Figura 19: La estimulación CCR7 con CCL21 induce nedilación de Cul-1. (A) y (B): Las CD5 (10⁶ células/ml) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin estimular (-) o se estimularon con CCL21 (18 nM), durante 5 min en (A) y los tiempos indicados en (B). Después las células se lisaron y analizaron mediante SDS-PAGE seguido de WB en los que se usaron anticuerpos frente a Nedd8. La banda de Nedd8 se cuantificó y se representa como incremento relativo respecto a las células sin estimular, a las que se asignó un valor arbitrario de 1. En (A) se muestra un WB representativo frente a los anticuerpos anti-Nedd8 y anti-Cul-1, empleándose Erk1 como control de carga. A continuación, se representa la media ± SEM (N=15). En la figura (B) se representa, al igual que en (A) la media ± SEM (N=6-15). **(C)** Las células (20-30 × 10⁶ CD5) se trataron igual que en (A) con la diferencia de que, tras la estimulación con CCL21, las CD5 se resuspendieron en buffer de lisis y, posteriormente, se inmunoprecipitó Cul-1. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE, y posteriormente se analizó mediante WB la presencia de Cul-1 y Nedd8. **(D)** Las células (10⁶ CD5/ml) fueron tratadas como en (A), con la diferencia de que, previo a la estimulación con CCL21, las células fueron pre-tratadas con toxina pertúsica (PTX, 100ng/ml 3h). Posteriormente las CD5 fueron estimuladas, lisadas, separadas mediante SDS-PAGE y analizadas mediante WB con anticuerpos frente a Nedd8 y p-ERK1/2. Se usó un anticuerpo frente β-actina para confirmar la igualdad de la carga. En el diagrama de barras se representa la media ± SEM (N=10).

Para confirmar que la proteína nedilada en respuesta a la estimulación de CCR7 es Cul-1, se realizó una inmunoprecipitación (IP) de Cul-1, seguida de un WB con un anticuerpo anti-Nedd8. Como se observa en la figura 19C, se produjo un aumento de la nedilación de Cul-1 tras la estimulación de las CD5 con CCL21.

CCR7 induce señales intracelulares a través de las proteínas G heterotriméricas. Para analizar si tras la estimulación de CCR7, la familia $G_{\alpha i}$ media la nedilación observada, se trataron las CDs con la toxina pertúsica (PTX), un inhibidor selectivo de esta familia de proteínas G. Los resultados muestran que el tratamiento con PTX inhibió el efecto estimulante de CCR7 sobre la nedilación, lo que sugiere la participación de las proteínas $G_{\alpha i}$ (figura 19D) en este proceso.

2. Las funciones reguladas por CCR7 en las CDs no dependen de la nedilación

CCR7 regula, además de la quimiotaxis, varias funciones de las CDs, incluyendo la supervivencia, la velocidad migratoria, la endocitosis y los cambios en citoarquitectura (Yanagawa and Onoe 2002; Yanagawa and Onoe 2003; Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005; Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015). A continuación analizamos si la nedilación estaba implicada en la regulación de las funciones de CCR7 en las CDs. Para ello utilizamos un inhibidor farmacológico de la nedilación, MLN4924 (MLN), que actúa inhibiendo a la enzima NAE, que participa en el primero de los tres pasos de la transferencia de Nedd8 a las proteínas Cullin, o nedilación (Soucy, Smith et al. 2009).

2.1 La inhibición de la nedilación no afecta a la supervivencia inducida por CCR7

En numerosos tipos celulares, incluyendo leucocitos, la nedilación de las proteínas Cullin está implicada en la regulación la supervivencia celular (Li, Liu et

al. 2013; Wang, Luo et al. 2015; Cheng, Hu et al. 2016). Como CCR7 regula la supervivencia de las CD_s (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009; Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015) analizamos si la nedilación de Cul-1 podía estar mediando estos efectos inductores de supervivencia. Para analizar la apoptosis las CD_s se tiñeron con Hoechst (**figura 20**), un método que permite apreciar los núcleos condensados y/o fragmentados, típicos de las células apoptóticas, y compararlos con los de las células sanas, que son más grandes y mantienen su integridad (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009; Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015) (**figura 20A**). En la **figura 20B(a)** se puede observar que el cultivo de las CD_s durante 48h en RPMI en ausencia de suero produjo un aumento en los niveles de apoptosis de las CD_s, que se redujo significativamente cuando las células se mantuvieron en presencia CCL21, tal como se había reportado previamente (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009; Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015). Cuando se analizó la apoptosis de las CD_s en las que se inhibió la nedilación mediante el tratamiento con MLN, se observó que, aunque la apoptosis aumentó tras el tratamiento, la estimulación de las CD_s con CCL21 redujo el porcentaje de células apoptóticas de manera equivalente a la observada en el en el control sin MLN (**figura 20B b**). La **figura 20C** muestra que el tratamiento con MLN produjo un completo bloqueo de la nedilación. Los resultados indican que, aunque la inhibición de la nedilación induce apoptosis basal en las CD_s, tal como se ha descrito previamente (Cheng, Hu et al. 2016), la estimulación de CCR7 induce supervivencia, aun cuando la nedilación se encuentra completamente inhibida.

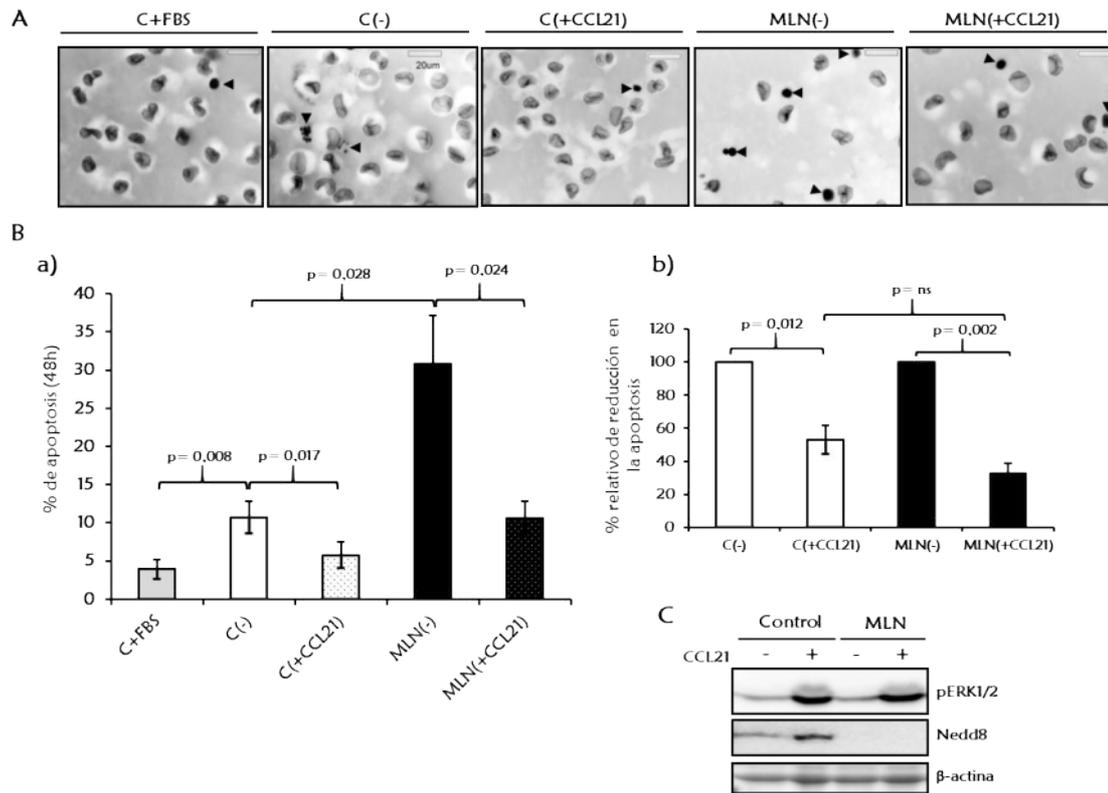


Figura 20: La inhibición de la nedilación no afecta a la supervivencia inducida por CCR7. Las CD_s (10⁶ células/ml) se resuspendieron en RPMI con 10% FBS (+FBS) o 0,1% de BSA (-) y se mantuvieron sin tratar (Control o C) o se trataron con MLN4924 (MLN, 0,5 µM 2h) tras lo cual las CD_s se estimularon con CCL21 (18 nM) (+CCL21) y se mantuvieron en cultivo a 37°C durante 48h, añadiéndose nuevamente CCL21 al medio cada 6h. Posteriormente las CD_s se adhirieron durante 1 h en cristales previamente cubiertos con Poli-L-ornitina. Posteriormente las células se fijaron con PFA 4% y se tiñeron los núcleos con Hoechst33342. Las preparaciones se analizaron al microscopio y se fotografiaron. En **(A)** se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento en la que las puntas de flecha señalan núcleos condensados o fragmentados que se corresponden con células apoptóticas. Los colores de las fotografías fueron invertidos porque así se puede apreciar mejor la condensación nuclear. **(B) a)** Se contaron alrededor de 500 células y se calculó el porcentaje de apoptosis (% medio ± SEM). **b)** Estos porcentajes se relativizaron respecto a las muestras no estimuladas para analizar el efecto de la quimioquina CCL21. **(C)** Una alícuota de estas muestras se analizó por SDS-PAGE seguido por WB con anticuerpos frente a Nedd8, pERK1/2 como control de estimulación de CCR7 y β-actina como control de carga. Se muestra que tras el tratamiento con MLN la nedilación (Nedd8) se encuentra totalmente inhibida (N=4).

La inhibición de la nedilación no afecta a la activación de la vía de NFκB inducida por CCR7.

Puesto que la activación de la vía de NFκB es uno de los mecanismos mediante los cuales CCR7 regula la supervivencia en las CD_s (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009) y se ha descrito previamente que la nedilación de Cul-1 está implicada en la activación de NFκB en las CD_s en

respuesta a LPS (Mathewson, Toubai et al. 2013), analizamos si la inhibición de la nedilación con MLN ejercía algún efecto sobre la activación de NFκB inducida por la estimulación de CCR7.

NFκB es un factor de transcripción que se encuentra en el citoplasma secuestrado por la proteína inhibitoria IκB. Sin embargo, diversos estímulos provocan la fosforilación de IκB, que induce su degradación, permitiendo que NFκB se trasloque al núcleo, donde regula la expresión de diversos genes promotores de supervivencia como Bcl_{xl}, un gen de la familia Bcl2 (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009). La medida de los niveles de IκB puede reflejar, de manera indirecta, el grado de activación de NFκB. Niveles elevados de IκB, indican que NFκB está inhibido, y, reducidos niveles de IκB implican que está activado. Para investigar si la nedilación juega un papel en la activación de NFκB, se analizó si la inhibición de la nedilación afecta la degradación de IκBα mediada por CCR7 y la traslocación de NFκB al núcleo de las CDs. Para ello se llevó a cabo el fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares, en células pre-tratadas con MLN o sin pre-tratar, y estimuladas con CCL21 o sin estimular. Como control positivo se emplearon CDs tratadas con TNFα, un conocido activador de la ruta de NFκB (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004). Como se puede observar en la [figura 21](#), la estimulación de CCR7 con CCL21, o con TNF-α, indujo la degradación de IκBα en el citoplasma de las CDs ([figura 21A y 21B](#)). La inhibición de la nedilación con MLN no afectó a la degradación de IκBα, lo que sugiere que la nedilación de Cul-1 no regula la degradación IκBα inducida por CCR7.

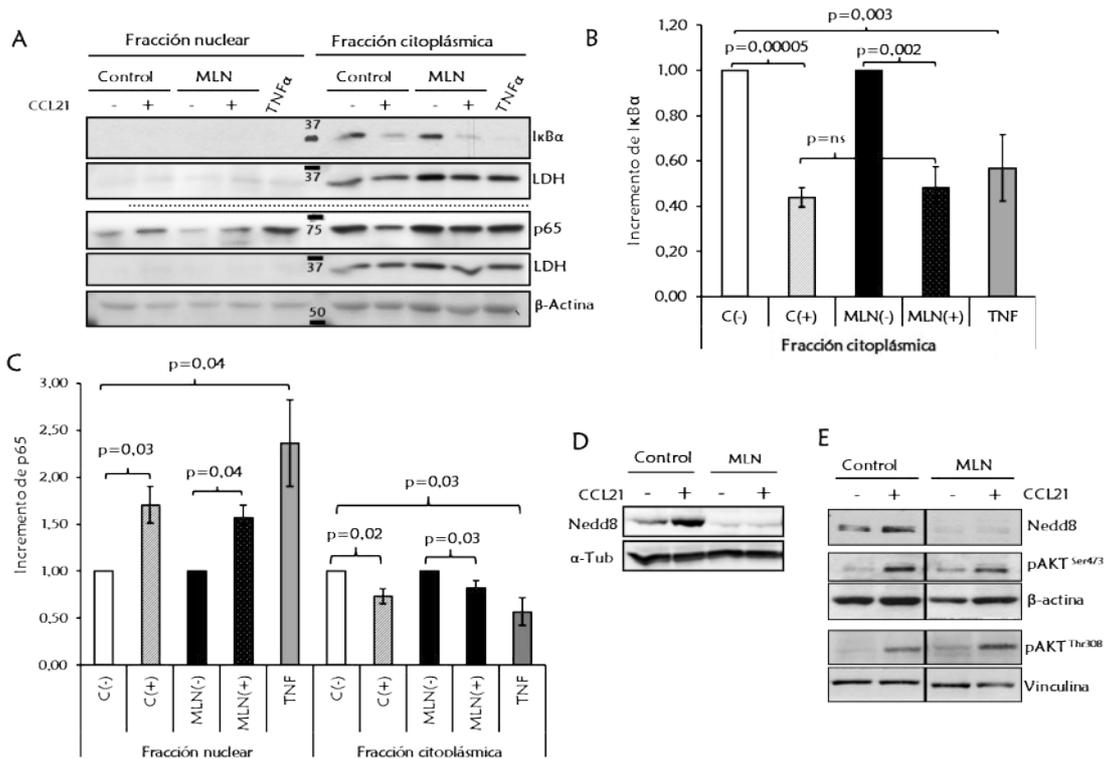


Figura 21: La inhibición de la nedilación no afecta a la activación de la vía de NF κ B inducida por CCR7: Las CD5 (5×10^6 células) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin tratar (Control o C) o se trataron con MLN4924 0,5 μ M durante 2 h (MLN), posteriormente las células se mantuvieron sin estimular (-) o fueron estimuladas con CCL21 (18 nM) (+) o TNF α (100 ng/ml) durante 45 min. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron en PBS frío y se llevó a cabo la extracción y fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares. **(A)** Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido de WB con anticuerpos frente a I κ B α y p65. Como control de carga se analizaron los niveles β -Actina y de LDH. Este último se utilizó también como marcador de citoplasma. **(B)** Se representa la cuantificación de los niveles de proteína I κ B α en la fracción citoplásmica estandarizados como incremento respecto a las muestras sin estimular [(-)] a las que se asigna un valor arbitrario de 1. **(C)** Se representa la cuantificación de los niveles de proteína p65 en la fracción citoplásmica y nuclear estandarizados como incremento respecto a las muestras sin estimular [(-)] a las que se asigna un valor arbitrario de 1. En las gráficas se representa la media \pm SEM (N=6). **(D)** Se comprobó mediante WB que la nedilación se encontraba inhibida. **(E)** Las CD5 (10^6 células/ml) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin tratar (Control o C) o se trataron con MLN4924 0,5 μ M durante 2 h (MLN), posteriormente las células se mantuvieron sin estimular (-) o fueron estimuladas con CCL21 (18 nM) (+) durante 5 min. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron lisadas y analizadas mediante SDS-PAGE seguido de WB con anticuerpos frente a Nedd8, p-AKT (Ser473), p-AKT (Thr308). Se utilizaron β -Actina y vinculina como controles de carga (N=3).

Cuando se analizaron mediante WB los niveles de p65, una molécula de la familia NF κ B, en el núcleo y el citoplasma (figura 21A y 21C), se observó que la estimulación de CCR7 con CCL21 o TNF- α indujo la traslocación de p65 al núcleo, como se sugiere por la observación de la caída en los niveles de p65 en el citoplasma y su aumento en el núcleo (figura 21C). Nuevamente, en las CD5 pretratadas con MLN, CCL21 indujo los mismos efectos de caída del p65

citoplásmico y aumento del nuclear, indicando que la nedilación de Cul-1 parece no tener ningún efecto sobre la traslocación de p65 al núcleo tras la estimulación de CCR7. La [figura 20D](#) confirma que la nedilación se inhibió correctamente en el experimento de fraccionamiento. Los resultados obtenidos sobre NFκB concuerdan con lo observado en el caso de IκBα.

La ruta de AKT es la principal ruta inductora de la supervivencia activada por CCR7 en las CD8 y es responsable de la activación de la ruta de NFκB (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009; Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015). En concordancia con estos resultados, se observó que MLN no afecta a la activación de AKT (fosforilación en serina 473 y en treonina 308) inducida por CCR7 ([figura 21E](#)).

2.2 La nedilación no regula la quimiotaxis inducida por CCR7

A continuación, estudiamos si la nedilación de Cul-1 podía estar involucrada en la regulación de la quimiotaxis, una función clave controlada por CCR7 en las CD8 (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005). Para ello realizamos experimentos en el sistema *transwell*, que mide la migración de las células de un pocillo superior hacia un pocillo inferior, comunicados entre sí por poros. En los resultados de los experimentos en *transwell*, el signo (-) significa que no hay quimioquina y (+), que se incluye CCL21 en el medio (pocillo superior/pocillo inferior). De este modo, en la condición (-/-) no hay quimioquina en ningún compartimiento, de tal manera que las células que migran al pocillo inferior lo

hacen de manera aleatoria. El punto (-/+) representa la migración quimiotáctica, puesto que existe un gradiente de concentración de CCL21. Por último, el punto (+/+), en el que hay quimioquina en ambos compartimentos y, por tanto, no hay gradiente de concentración, representa una migración aleatoria, que en caso de ser mayor que (-/-) se debe a un incremento en la velocidad migratoria, puesto que la quimioquina está induciendo aceleración en las células.

En la [figura 22A](#) se puede observar un experimento en un *Transwell*, donde el establecimiento de un gradiente quimiotáctico de CCL21 (pocillo superior -/ pocillo inferior +) induce un importante aumento en la quimiotaxis de las CD_s, como ya está descrito anteriormente (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005). Como se puede observar, el tratamiento con MLN no afecta a la quimiotaxis inducida por CCR7. Se comprobó que la nedilación de Cul-1 se bloquea completamente tras el tratamiento con MLN ([figura 22B](#)).

También puede apreciarse en las [figuras 22C](#) y [22D](#) que, aunque el tratamiento con MLN aumenta basalmente la activación de ERK1/2, la principal proteína reguladora de la quimiotaxis en las CD_s, su fosforilación dependiente de CCR7 no se vio afectada por el tratamiento con MLN.

En conjunto, estos resultados indican que el bloqueo de la nedilación no afecta ni a la activación de ERK1/2 ni a la quimiotaxis regulada por CCR7.

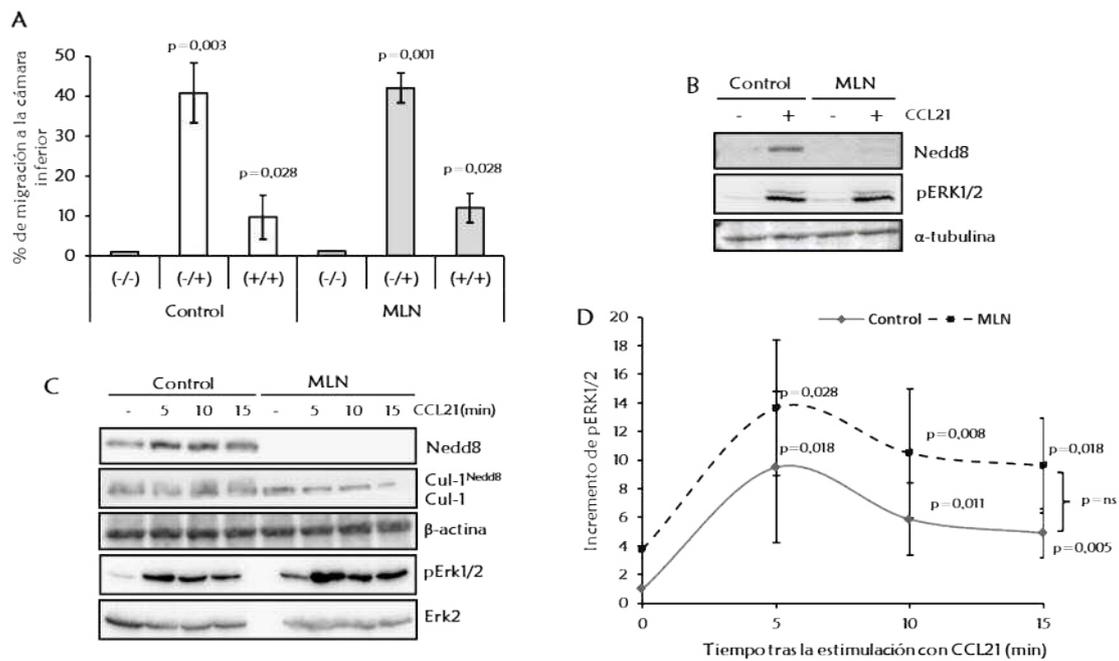


Figura 22: La inhibición de la nedilación no afecta a la quimiotaxis inducida por CCR7. (A) Las CD4⁺ (10⁵ células/100 μ l) disueltas en RPMI 0,1% BSA se mantuvieron sin tratar (Control) o se trataron con MLN4924 durante 2 h (MLN, 0,5 μ M). A continuación, las células se colocaron en el pocillo superior del Transwell. El pocillo inferior se rellenó con RPMI 0,1% BSA. El símbolo - representa ausencia de quimioquina y + significa que se añade CCL21 (18 nM) en el medio (pocillo superior/pocillo inferior). La placa se incubó durante 2 h a 37^o. Tras este tiempo se contó el número de CD4⁺ que habían migrado a la cámara inferior y se normalizaron respecto a sus valores de partida. Los datos se representan como porcentaje de migración \pm SEM (N=6). **(B)** Alícuotas tomadas del experimento (A) se analizaron mediante SDS-PAGE seguida de WB, con anticuerpos frente a Nedd8, pERK1/2 y α -tubulina, que fue usada como control de carga. **(C)** Las CD4⁺ (10⁶ células/ml) se trataron igual que en (A) con MLN4924 (MLN), después las células se estimularon con CCL21 (18 nM) durante los tiempos indicados. Las muestras se lisaron y analizaron mediante SDS-PAGE seguida de WB con anticuerpos frente a Nedd8, Cul-1 y p-ERK1/2. ERK2 y β -actina fueron usados como controles de carga. Se cuantificaron los niveles de pERK1/2, representados en **(D)** y normalizados frente a las muestras control sin estimular (tiempo 0), a las que se asignó un valor arbitrario de $1 \pm$ SEM (N=10).

A continuación se analizó si la nedilación juega algún papel en la regulación de otras funciones controladas por CCR7, como son la velocidad migratoria (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005), la endocitosis (Yanagawa and Onoe 2003), o la citoarquitectura celular (Yanagawa and Onoe 2002).

2.3 La nedilación no controla la velocidad migratoria inducida por CCR7

En el experimento de *transwell* mencionado anteriormente (figura 21A) se puede determinar, de manera indirecta, si se producen cambios en velocidad

migratoria de las CD_s (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005). Como se explicó previamente, si se cuantifica el porcentaje de CD_s que migran cuando se añade la quimioquina tanto en el pocillo superior e inferior del *transwell* (+/+) con respecto a aquel en donde no se pone quimioquinas (-/-) se evalúa la velocidad migratoria. Los datos obtenidos en las condiciones (-/-) y (+/+) de la **figura 22A** se representan en la **figura 23**.

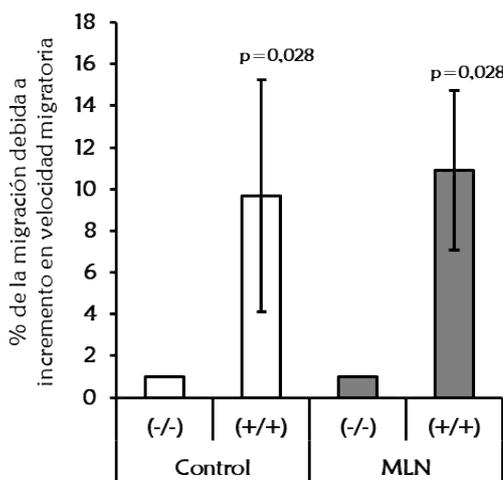


Figura 23: La inhibición de la nedilación no afecta a la velocidad migratoria inducida por CCR7:

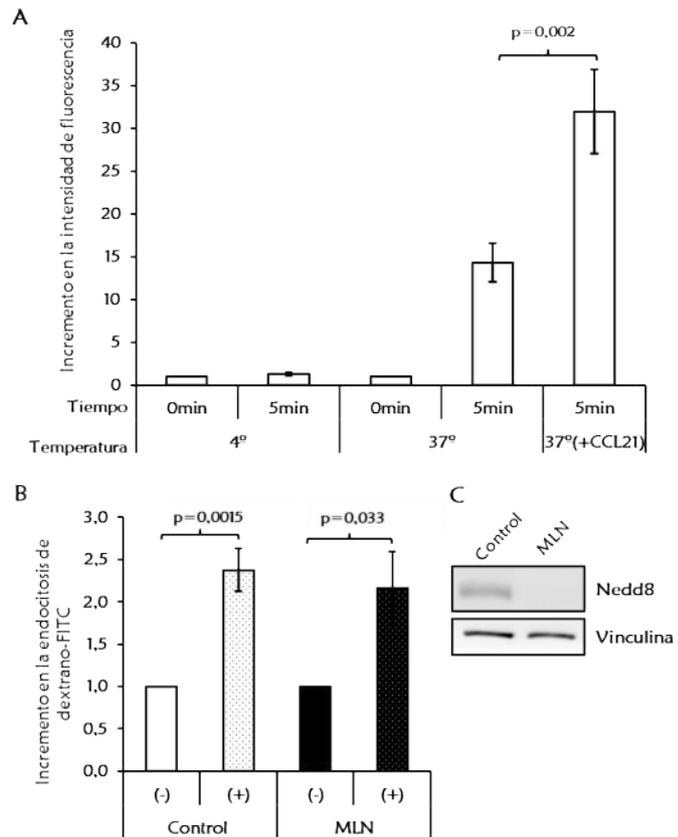
10⁵ CD_s disueltas en RPMI 0,1% BSA se mantuvieron sin tratar (Control) o se trataron con MLN4924 durante 2 h (MLN, 0,5 μM). A continuación se colocaron en el pocillo superior permeable del Transwell. El pocillo inferior se rellenó con RPMI 0,1% BSA. (-/-) y (+/+) representan (pocillo superior/pocillo inferior), donde + significa que se añadió CCL21 (18 nM). La placa se incubó durante 2h a 37° y 5% de CO₂. Tras este tiempo se contó el número de células que habían migrado a la cámara inferior y se normalizaron respecto a sus valores de partida. Los datos se representan como porcentaje ± SEM (N=6).

Como se observa en esta figura, cuando se compara la migración de las CD_s en los transwell (+/+) frente a (-/-), se observa que la estimulación de CCR7 indujo un aumento en la velocidad migratoria de las células, tal como hemos descrito previamente (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005; Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015). Si se analiza esta migración en las CD_s control y las CD_s tratadas con MLN, se observa que se produce un aumento similar en la velocidad migratoria en ambos casos (**figura 23**). Por tanto, los resultados indican que la nedilación no está implicada en la regulación de la velocidad migratoria inducida por la estimulación de CCR7 en las CD_s.

2.4 La nedilación no regula la endocitosis dependiente de CCR7

CCR7 regula la endocitosis en las CD_s (Yanagawa and Onoe 2003; Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015). En el siguiente experimento utilizamos dextrano-FITC para analizar la endocitosis en las CD_s. Se considera endocitosis a aquella captación de dextrano que se produce cuando las células están a 37°C, y ésta disminuye cuando disminuye la temperatura del medio, por lo que, la fluorescencia que observemos al mantener a las células 4°C, se atribuye a la absorción pasiva de dextrano. Cuando las CD_s mantenidas a 37° se estimularon con CCL21 durante 5 min, se observó un incremento en la cantidad de fluorescencia (**figura 24A**), esto es, en la endocitosis de dextrano-FITC, respecto a la fluorescencia de las células a 37°C sin estimular, como ya está descrito previamente (Yanagawa and Onoe 2003; Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015). Este incremento refleja el aumento de la endocitosis dependiente de CCR7. Cuando analizamos la endocitosis a 37° (**figura 24B**), vemos que, tras la estimulación con CCL21, no se observaron diferencias entre las células tratadas con MLN y las células control. Por tanto, los datos indican que la endocitosis inducida por la activación de CCR7 no requiere de la nedilación. Se comprobó la inhibición de la nedilación mediante WB (**figura 24C**)

Figura 24: La nedilación no regula la endocitosis dependiente de CCR7. Se utilizaron 3×10^5 CDs resuspendidas en RPMI 10% FBS y HEPES 20 mM, que fueron incubadas con dextrano-FITC (1 mg/ml) durante los tiempos indicados. Como control de absorción pasiva de dextrano-FITC, las CDs se mantuvieron a 4° durante todo el experimento. Las muestras donde se valoró la endocitosis se incubaron con dextrano-FITC a 37° en el incubador en presencia o ausencia de CCL21 (18 nM). Posteriormente las CDs se lavaron varias veces en PBS 0,1% BSA y se resuspendieron en PBS para su análisis por citometría de flujo. **(A)** muestra la intensidad de fluorescencia de las CDs en las distintas condiciones y permite distinguir la endocitosis de dextrano-FITC. En **(B)** se compara la endocitosis de dextrano-FITC en células sin tratar (Control) y pre-tratadas con MLN4924 (MLN, 0,5 μ M 2 h) y estimuladas (+) o no (-) con CCL21. Los datos se representan como incremento en la intensidad de fluorescencia estandarizado frente a las células sin quimioquina, a las que se asigna un valor arbitrario de $1 \pm$ SEM (N=7). **(C)** Se comprobó mediante WB que la nedilación estaba inhibida por el tratamiento con MLN.



2.5 La nedilación no está implicada en los cambios de morfología celular producidos por CCR7

Para que las CDs migren correctamente es necesario que experimenten cambios en citoarquitectura, particularmente, cambios en la configuración de la F-actina. En la **figura 25A** se muestran unas imágenes de microscopía de fluorescencia en las que se observa el citoesqueleto de actina de las CDs teñido con faloidina-TRITC. En esta figura se puede apreciar como al estimularse las células con CCL21 la morfología cambia de un fenotipo redondeado a un fenotipo expandido, que refleja el aplastamiento (“spreading”) de las CDs sobre el sustrato (Yanagawa and Onoe 2002). Es posible cuantificar este fenómeno analizando la longitud del

diámetro mayor de estas células antes y después de la estimulación de las CDs (figura 25B). Como se observa en la gráfica, la longitud del diámetro mayor aumenta significativamente al exponer las células a la quimioquina CCL21. Además, tras la estimulación con CCL21, no se apreciaron diferencias en “spreading” entre las CDs no tratadas (Control) o tratadas con MLN4924 (MLN).

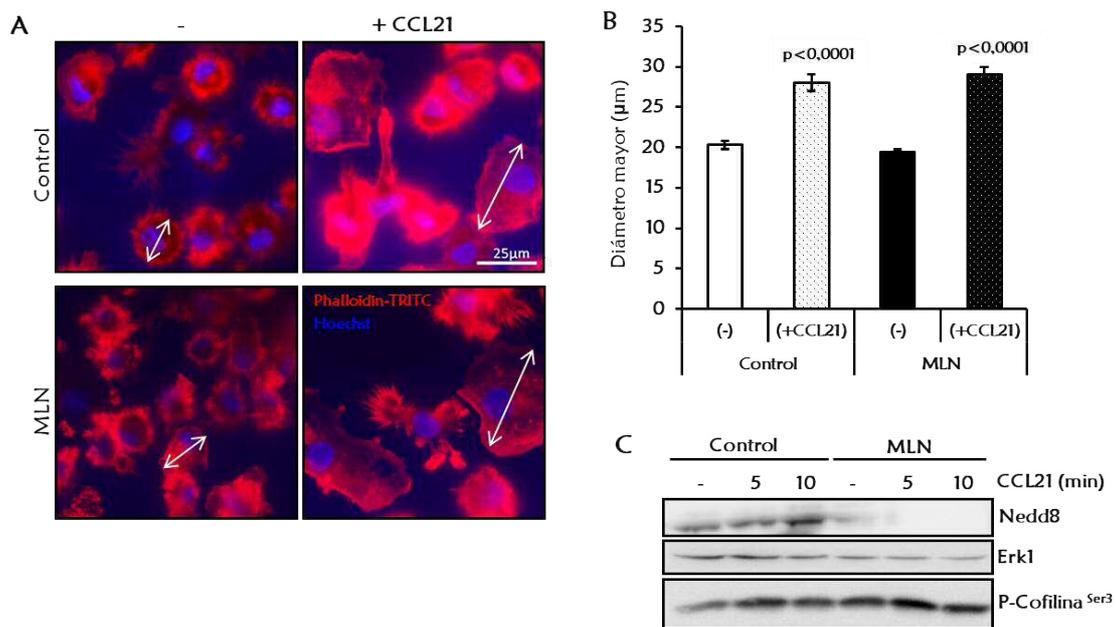


Figura 25: La nedilación no está implicada en los cambios de citoarquitectura inducidos por CCR7 en las CDs: Las CDs (5×10^5) se resuspendieron en RPMI 0,1% BSA y se trataron con MLN4924 (MLN, 0,5 μ M) durante 2h o se mantuvieron sin tratar (Control). Posteriormente se sembraron en cristales recubiertos con poli-L-ornitina y se dejaron adherir durante 1 h a 37°C, tras lo cual se estimularon con CCL21 (18 nM) durante 10 min, se fijaron con PFA 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% en PBS. Después, las muestras tiñeron con Faloidina-TRITC (5 μ g/ml) y Hoechst 33258 (10 μ g/ml). **(A)** Las muestras se analizaron en el microscopio y se fotografiaron. **(B)** Las imágenes se analizaron para cuantificar la expansión de las CDs maduras (~120 CDs) tras ser estimuladas con CCL21, a través de la medición de su diámetro mayor, representado en valores absolutos (diámetro celular \pm SEM). **(C)** Las CDs (10^6 cel/ml) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA, se pretrataron con MLN como en (A) y se estimularon con CCL21 (18 nM) los tiempos indicados. Después las CDs se lisaron y analizaron mediante SDS-PAGE seguido de WB con anticuerpos frente a Nedd8, p-Cofilina-1 (Ser 3) o frente a Erk1, que fue usado como control de carga (N=3).

Una de las moléculas que regula la dinámica de la actina es la Cofilina-1. Tras la estimulación de CCR7, esta proteína se fosforila de manera inhibitoria en la serina 3. Si analizamos la fosforilación Cofilina-1 mediante WB (figura 25C), se

observa que, tras la estimulación con CC21, dicha fosforilación no se encuentra alterada por el pretratamiento con MLN. Por tanto, estos resultados indican que la nedilación no se requiere para que CCR7 induzca cambios en el citoesqueleto en las CD_s.

3. Nedd8 se concentra en el núcleo de las células dendríticas

Los resultados negativos mencionados en el apartado 2, nos hicieron cuestionarnos acerca de la posible localización de la nedilación inducida por CCR7, pues, algunos de los mediadores activados por CCR7 actúan en el citoplasma de las CD_s, pero otros ejercen su acción en el núcleo. En este sentido, llevamos a cabo experimentos de fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares. En estos experimentos observamos, por WB, que Nedd8 o Cul-1 nedilada (Cul-1^{Nedd8}) se concentraba en el núcleo de las CD_s (**figuras 26A y 26B**). Además, la estimulación de CCR7 indujo nedilación de Cul-1 en el núcleo de las células, que se vio bloqueada por el tratamiento con MLN. Sin embargo, los niveles de Cul-1 sin modificar son similares en el núcleo y el citoplasma de las CD_s, aunque se vio una disminución de Cul-1 en el citoplasma de las células control tras la estimulación con CCL21. Los experimentos de inmunofluorescencia (IF), con anticuerpos frente a Nedd8 y Cul-1, mostraron un resultado similar (**figura 26C**), esto es, Cul-1 total se encuentra más homogéneamente distribuido por toda la célula, mientras que Nedd8 se concentra en el núcleo de las CD_s.

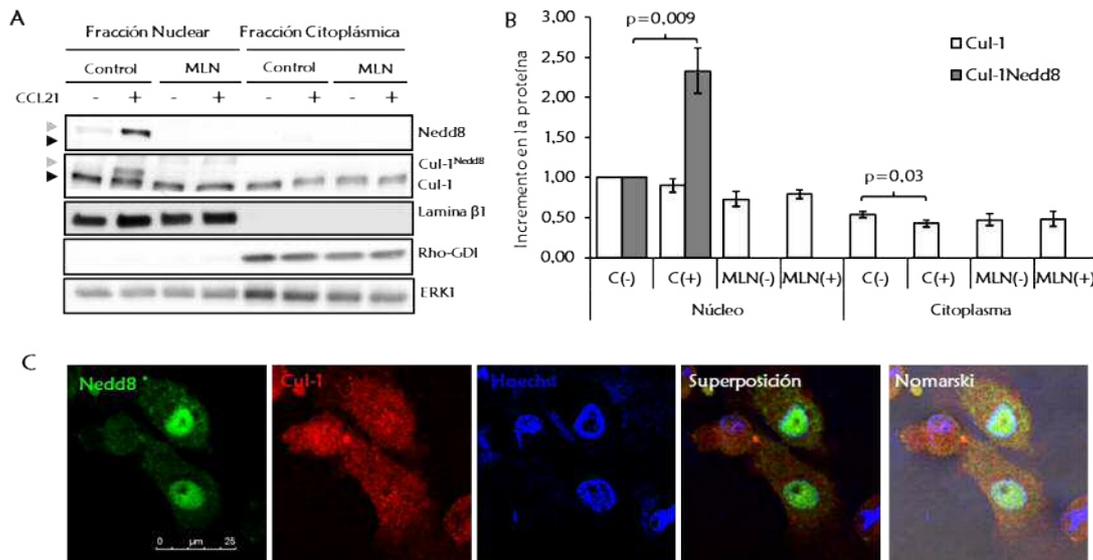


Figura 26: Nedd8 se concentra en el núcleo de las células dendríticas. Las CDs (5×10^6 cel/ml) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin tratar (Control) o se trataron con MLN4924 durante 2 h (MLN). Posteriormente, las células fueron estimuladas con CCL21 (18 nM) (+) durante 5 min. Transcurrido este tiempo, las CDs se lavaron en PBS frío y se llevó a cabo la extracción y el fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares. **(A)** Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido de WB con anticuerpos frente a Nedd8, Cul-1 y Erk1, que fue usado como control de carga. Se emplearon anticuerpos frente a la proteína nuclear Lamina β 1 y la proteína citoplásmica Rho-GDI, que fueron usadas como controles de posible contaminación entre fracciones nuclear y citoplásmica **(B)** Se representa la cuantificación de los niveles relativos de Nedd8 y Cul-1 en las CDs del apartado A, estandarizada respecto a la fracción nuclear (C-), a la que se asigna un valor arbitrario de $1 \pm$ SEM (N=5). **(C)** 5×10^4 CDs resuspendidas en RPMI con 0,1% BSA dejaron adherir sobre cristales recubiertos de poli-L-ornitina. Las células se estimularon con CCL21 (18 nM) durante 5 min y luego se fijaron con PFA 4%, se permeabilizaron con metanol frío y se tiñeron con anticuerpos específicos frente a Nedd8 y Cul-1. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Las preparaciones fueron montadas y analizadas mediante microscopía confocal. Se muestra una fotografía representativa de una sección confocal (N=4).

4. Cul-1^{Nedd8} forma parte de un complejo SCF en el núcleo.

Los resultados negativos obtenidos con relación a los efectos de la inhibición de la nedilación sobre las funciones descritas reguladas por CCR7 y el descubrimiento de que Nedd8 se encontraba fundamentalmente en el núcleo de las CDs nos llevaron a plantearnos si Cul-1^{Nedd8} formaba parte del complejo E3 ligasa SCF también en el núcleo.

Como se ha comentado en la introducción, el complejo SCF consta de 3 proteínas invariables: Rbx1, Skp1 y Cul-1. En los siguientes experimentos nos

centramos en el estudio de la localización de Rbx1 y Skp1 en las CDs, así como en el análisis de su interacción con Cul-1. Para ello, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia (IF), ensayo de ligación por proximidad (Proximity ligation Assay, PLA) e IP.

En primer lugar, los experimentos de IF frente a Rbx1 y Skp1 (**figura 27A**), sugieren que ambos tienen una distribución similar a la de Nedd8, pues se encuentran concentrados en el núcleo de las CDs, aunque de manera menos acusada que Nedd8.

Una vez comprobado que Rbx1 y Skp1 están presentes también en el núcleo de las CDs, usamos la técnica PLA para analizar si ambas proteínas están lo suficientemente cercanas a Cul-1 como para sugerir que están interaccionando y formando un complejo. La técnica PLA se ha empleado previamente para estudiar la presencia de complejos moleculares analizando la cercanía entre sus componentes (Soderberg, Gullberg et al. 2006).

En la **figura 27B** puede observarse mediante microscopía de fluorescencia una fotografía de una sección confocal de un PLA entre Cul-1 y Rbx1 donde se aprecian puntos fluorescentes tanto en núcleo como en citoplasma. Del mismo modo se observa un PLA entre Cul-1 y Skp1 donde se aprecian puntos fluorescentes en el núcleo de las CDs.

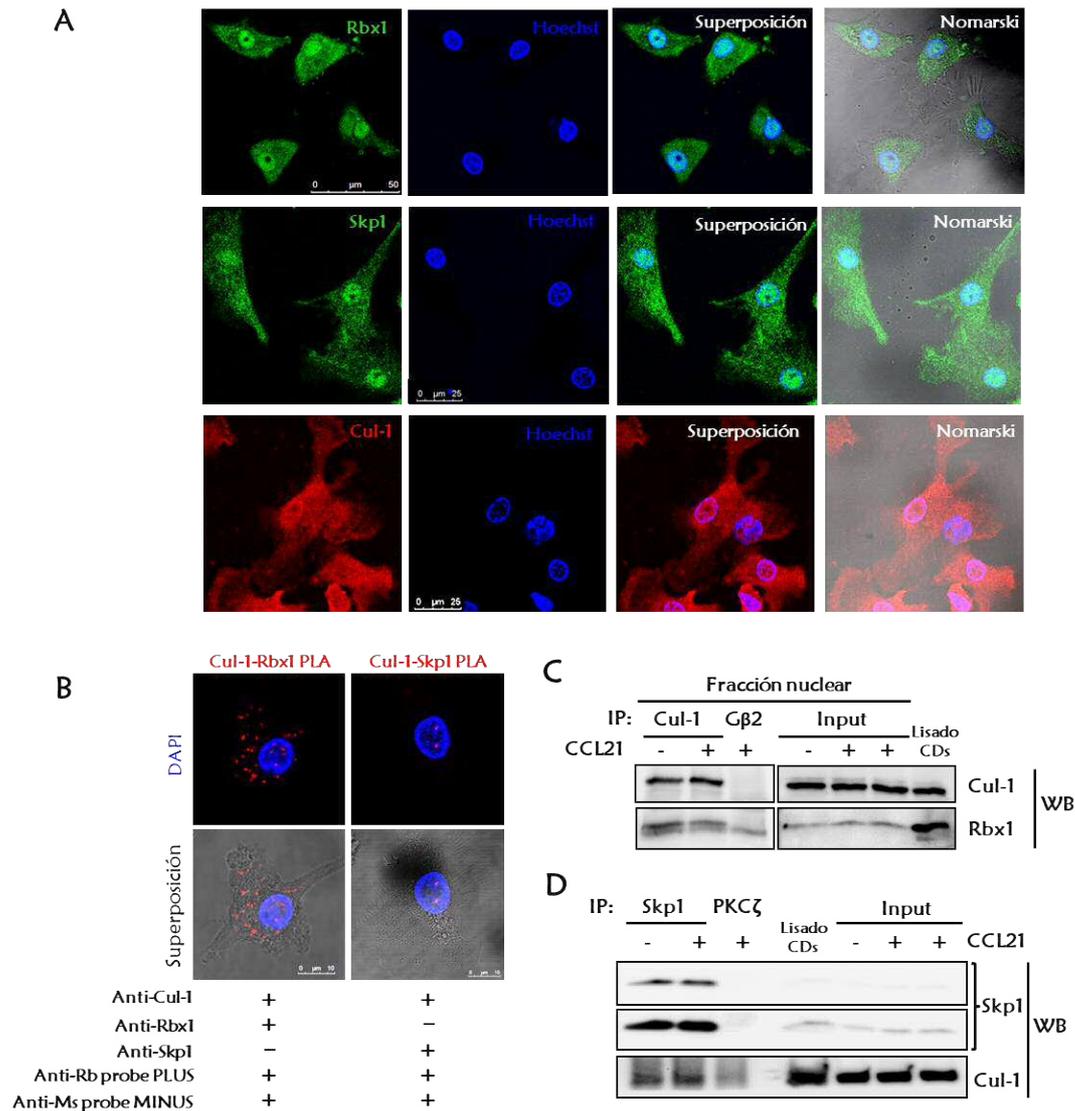


Figura 27: Cul-1^{Nedd8} forma parte del complejo SCF en el núcleo. (A) A las CD_s resuspendidas en RPMI con 0,1% BSA (5×10^4) se les permitió adherirse sobre cristales recubiertos de poli-L-ornitina, se estimularon con CCL21 (18 nM) durante 5 min y se fijaron con PFA 4%, después fueron permeabilizadas con metanol frío y teñidas con anticuerpos específicos frente a Rbx1, Skp1 o Cul-1. Los núcleos se teñieron con Hoechst 33342. Las preparaciones fueron montadas y analizadas mediante microscopía confocal. Se muestra una fotografía representativa de una sección confocal (N=3). (B) Las CD_s fueron tratadas igual que en (A) hasta la incubación de las mismas con los anticuerpos primarios Cul-1 y Rbx1 o Cul-1 y Skp1, tras lo cual se llevó a cabo un PLA (ver Materiales y Métodos) con las sondas arriba mencionadas. Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal y se muestra una fotografía representativa de una sección confocal. Los puntos fluorescentes rojos se representan una señal positiva del PLA (N=3). (C) Las CD_s ($20-30 \times 10^6$ CD_s) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin estimular (-) o estimuladas con CCL21 (18 nM) durante 5 min (+) a 37°. Después, las CD_s se lavaron en PBS frío y se llevó a cabo la extracción de proteínas citoplásmicas y la lisis de los núcleos en buffer de IP. Posteriormente se llevó a cabo la IP nuclear de Cul-1. Se tomaron alícuotas de las muestras antes de la IP para analizar la carga. Las muestras se analizaron mediante WB usando anticuerpos frente a Cul-1 y Rbx1. (D) Las CD_s humanas maduras ($20-30 \times 10^6$ CD_s) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin estimular (-) o estimuladas con CCL21 (18 nM) durante 5 min (+) a 37°. Después, las células se lisaron resuspendiéndolas en buffer de lisis y se llevó a cabo la IP de Skp1. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y WB con anticuerpos frente a Cul-1 y Skp1.

Para confirmar que existe interacción entre Cul-1, Skp1 y Rbx se realizaron experimentos de IP. En la [figura 27C](#) se puede observar un experimento de IP de Cul-1 nuclear. Como se observa en la figura, el anticuerpo inmunoprecipitó a Cul-1 adecuadamente y se observó la co-inmunoprecipitación de Rbx1, sugiriendo que estas dos proteínas interaccionan entre sí.

Por otro lado, se realizó una IP con un anticuerpo frente a Skp1 ([figura 27D](#)). Observamos que Skp1 se inmunoprecipitó correctamente y que co-inmunoprecipitó con Cul-1.

Estos experimentos sugieren que los miembros del complejo SCF, Rbx1 y Skp1 se localizan en el núcleo y además que se encuentran interaccionando con Cul-1. Por tanto, Cul-1^{nedd8} parece estar formando el complejo E3 ligasa SCF en el núcleo de las CD_s.

5. CCR7 induce nedilación/activación de SCF que estimula la ubiquitinación de proteínas en el núcleo de las CD_s.

5.1 CCR7 estimula la poliubiquitinación de tipo K48 en el núcleo de las CD_s a través de la nedilación.

Una vez confirmado que Cul-1 se encontraba nedilado y formando parte del complejo E3 ligasa SCF en el núcleo de las CD_s, en los siguientes experimentos estudiamos si el complejo SCF se encontraba ubiquitinando proteínas nucleares. Como se ha mencionado anteriormente, existen distintos tipos de ubiquitinación dependiendo del residuo conservado de la ubiquitina (Ub) que media el enlace

con la siguiente molécula de ubiquitina en la cadena (McDowell and Philpott 2013). Se ha establecido que los distintos tipos de enlaces entre Ub's pueden determinar un destino diferente para la proteína marcada. El marcaje de una proteína por una cadena de al menos 4 Ub's unidas entre sí a través de la lisina 48 (K48) induce la degradación de dicha proteína por el proteasoma 26S (Thrower, Hoffman et al. 2000). Puesto que el complejo SCF participa en la ubiquitinación de proteínas que son posteriormente degradadas por el proteasoma, analizamos si la estimulación con CCR7 podía estar induciendo poliubiquitinación de tipo K48 y si este fenómeno podía estar mediado por la nedilación de Cul-1 y la consiguiente activación de SCF. Para ello se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente las moléculas de Ub unidas entre sí a través de la K48 (Poli-Ub-K48). En la [figura 28](#) se representa un fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares de células control y tratadas con MLN y estimuladas (+) o no (-) durante 5 min con CCL21. Cuando analizamos los resultados mediante WB, como se puede observar en la figura, la estimulación de las CDs con CCL21 induce un aumento en la nedilación de Cul-1 en el núcleo de las CDs y el tratamiento con MLN inhibe por completo la nedilación de Cul-1. Cuando analizamos las proteínas que se encuentran poliubiquitinadas con cadenas de ≥ 5 unidades de Ub (≥ 50 KDa) con uniones tipo K48, además de que se observa que existe una mayor cantidad de dichas proteínas en el núcleo de las CDs respecto al citoplasma, la estimulación con CCL21 induce un aumento significativo en los niveles de Poli-Ub-K48 en el núcleo de estas células. Además, dicho fenómeno se previene cuando las células son pre-tratadas con MLN,

sugiriendo que se requiere nedilación para que se produzca la ubiquitinación observada (figura 28A y 28B).

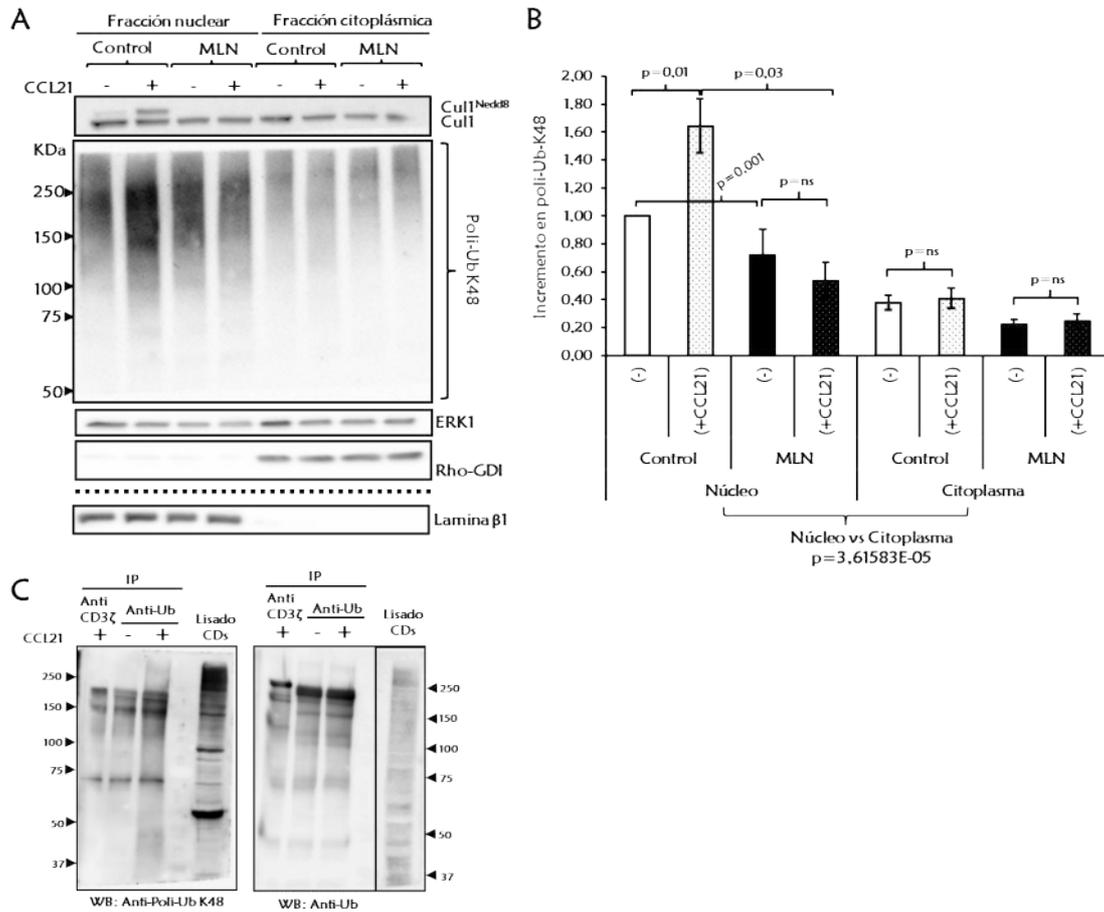


Figura 28: CCR7 estimula la poliubiquitinación de proteínas tipo K48 en el núcleo de las CDs a través de la nedilación. Las CDs (5×10^6 cel/ml) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin tratar (Control) o se trataron con MLN4924 durante 2h (MLN, 0,5 μ M), posteriormente las células fueron estimuladas con CCL21 (18 nM) (+) durante 5 min. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron en PBS frío y se llevó a cabo la extracción y fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y nucleares. **(A)** Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido de WB con anticuerpos frente a Cul-1, Poli-Ub-K48, Erk1 como control de carga y Lamina β 1 y Rho-GDI como controles de carga y de contaminación entre fracciones. **(B)** Se representa la cuantificación de los niveles de poliubiquitinación en las CDs del apartado A, estandarizados respecto a la fracción nuclear sin estimular, a la que se asigna un valor arbitrario de $1 \pm$ SEM (N=8). **(C)** Las CDs humanas maduras ($20-30 \times 10^6$ CDs) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin estimular (-) o estimuladas con CCL21 (18 nM) durante 5 min (+) a 37°. Después, las células se lisaron resuspendiéndolas en buffer de lisis y se llevó a cabo la IP de la ubiquitina total (Ub). Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y WB con anticuerpos frente a la Poli-Ub K48 y la ubiquitina total (Ub).

A continuación, estudiamos si CCR7 producía un aumento en la ubiquitinación de manera general, o exclusivamente sobre la poliubiquitinación de tipo K48.

Para ello, inmunoprecipitamos las proteínas ubiquitinadas con un anticuerpo que

reconoce tanto cadenas de Ub de los distintos tipos y tamaños, como ubiquitina libre. En la [figura 28C](#) observamos que se inmunoprecipitó la misma cantidad de Ub total en células estimuladas y sin estimular, pero dicho inmunoprecipitado se vio enriquecido en cadenas de Poli-Ub-K48 en células estimuladas con CCL21. Estos resultados indican que CCR7 induce un aumento en la Poli-Ub-K48 en el núcleo de las CD4 y que dicho fenómeno requiere de la nedilación.

También analizamos mediante IF doble, si Nedd8 y Ubiquitina (Ub) co-localizan en el núcleo de las CD4, así como el efecto del tratamiento de estas células con MLN. Como se observa en la [figura 29A](#), la Ub tiene una distribución mayormente nuclear en las CD4, coincidiendo con la distribución de Nedd8. Sin embargo, cuando las CD4 son pre-tratadas con MLN, se observa una disminución de los niveles de Nedd8 en el núcleo, que va acompañada también de una disminución de los niveles de Ub nucleares. Estos resultados sugieren nuevamente que la nedilación es necesaria para que se produzca la ubiquitinación de las proteínas nucleares.

Para asegurarnos de que Nedd8 y la Ubiquitina se encontraban lo suficientemente cerca como para que SCF activo esté interaccionando con la ubiquitina, transfiriéndola a la proteína diana, se realizaron experimentos de PLA entre ambas proteínas en células pre-tratadas o no pre-tratadas con MLN y estimuladas con CCL21 ([figura 29B](#)). Después se cuantificó el número de puntos fluorescentes en núcleo y citoplasma de cada célula ([figura 29C](#)) y se observó que la señal fluorescente era mayormente nuclear, pues se observaron aproximadamente el doble de puntos fluorescentes PLA en el núcleo respecto al

citoplasma. Además, cuando las CDs, fueron tratadas con MLN, dichos puntos fluorescentes se redujeron drásticamente, hasta aproximadamente la mitad, coincidiendo con los resultados observados en la IF. Estos resultados indican que la cercanía de Nedd8 y Ub en el núcleo de las CDs depende de la existencia de nedilación.

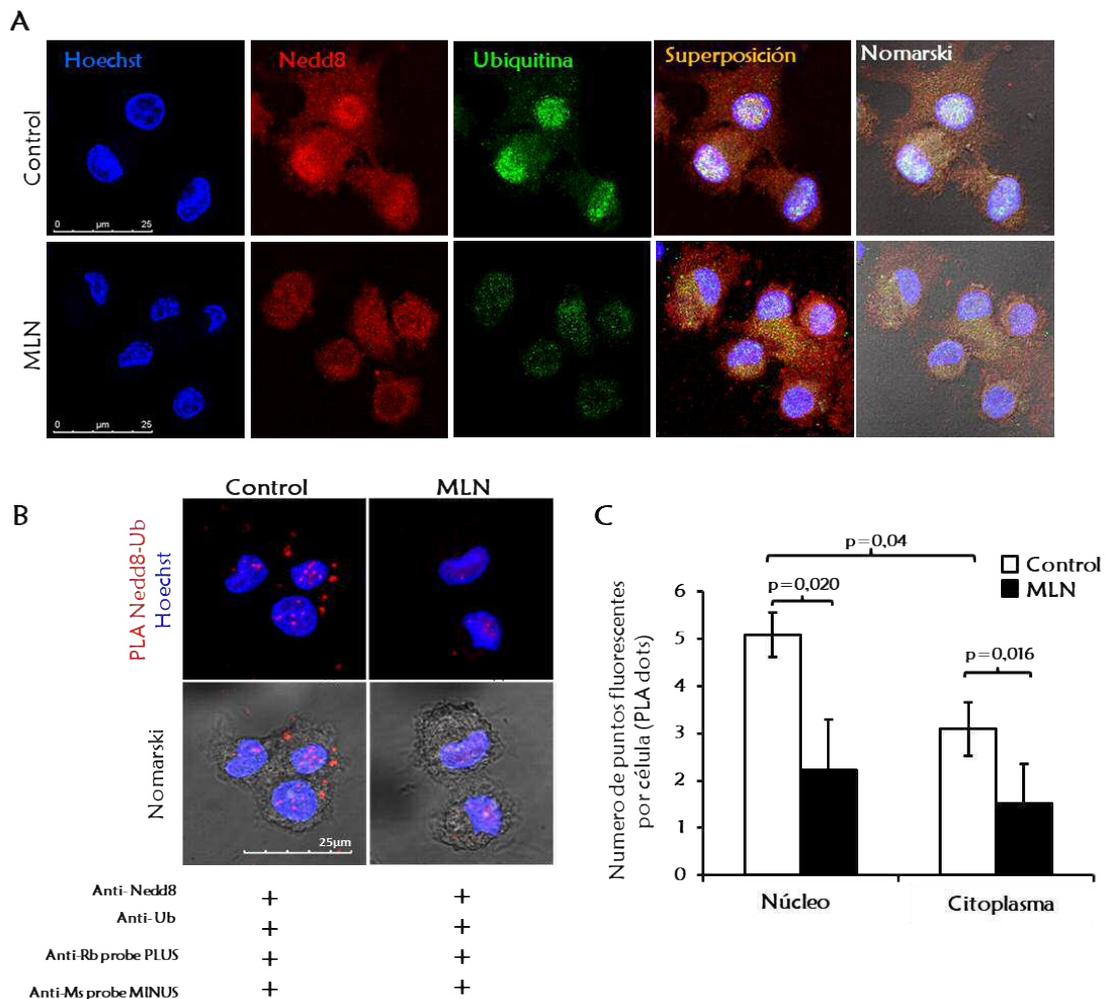


Figura 29: La ubiquitinación nuclear depende de nedilación en las CDs. (A) 5×10^4 CDs resuspendidas en RPMI con 0,1% BSA fueron tratadas con MLN4924 (0,5 μ M 2h) y adheridas sobre cristales recubiertos de poli-L-ornitina. Las células fueron estimuladas con CCL21 (18 nM) durante 5 min, fijadas con PFA 4%, permeabilizadas con metanol frío y teñidas con anticuerpos específicos frente a Ubiquitina (Ub) y Nedd8. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Las preparaciones fueron montadas y analizadas por microscopía confocal. Se muestra una fotografía representativa de una sección confocal (N=5). (B) Las CDs fueron tratadas igual que en (A) hasta la incubación de las mismas con los anticuerpos primarios Ub y Nedd8, tras lo cual se llevó a cabo un PLA (descrito en materiales y métodos). Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal y se muestra una fotografía representativa de una sección confocal. Los puntos fluorescentes rojos se representan una señal positiva del PLA. (C) Las muestras del apartado (B) fueron analizadas y se cuantificó el número de puntos fluorescentes por célula en el núcleo y el citoplasma de las CDs, que se representa en valores absolutos \pm SEM (N=4).

Tras la estimulación de las CDs con CCL21 no se observaron diferencias en los niveles de Ub mediante IF, en concordancia con los resultados de la IP de la **figura 28C**. Tampoco se observaron cambios significativos en cuanto al número de puntos fluorescentes en los experimentos de PLA (no mostrado).

5.2 La nedilación específica de Cul-1 regula la ubiquitinación inducida por CCR7 en CDs.

Puesto que MLN es un inhibidor del proceso de nedilación y hay otras proteínas que se nedilan además de Cul-1, quisimos confirmar nuestros resultados mediante la reducción de la expresión de Cul-1 con un siRNA. Para ello las CDs se nucleofectaron con un pool de siRNAs frente a Cul-1 y se analizaron los niveles de Cul-1 48h más tarde mediante WB e IF. Posteriormente se analizaron los niveles de ubiquitinación en respuesta a CCL21 en células silenciadas y control por ambas técnicas.

La **figura 30A** muestra 3 donantes sometidos a un silenciamiento de Cul-1. Como se puede observar, la reducción en los niveles de Cul-1 varió de un donante a otro (**figura 30A a**). La disminución en los niveles de Cul-1 se observó también mediante IF (**figura 30A b**).

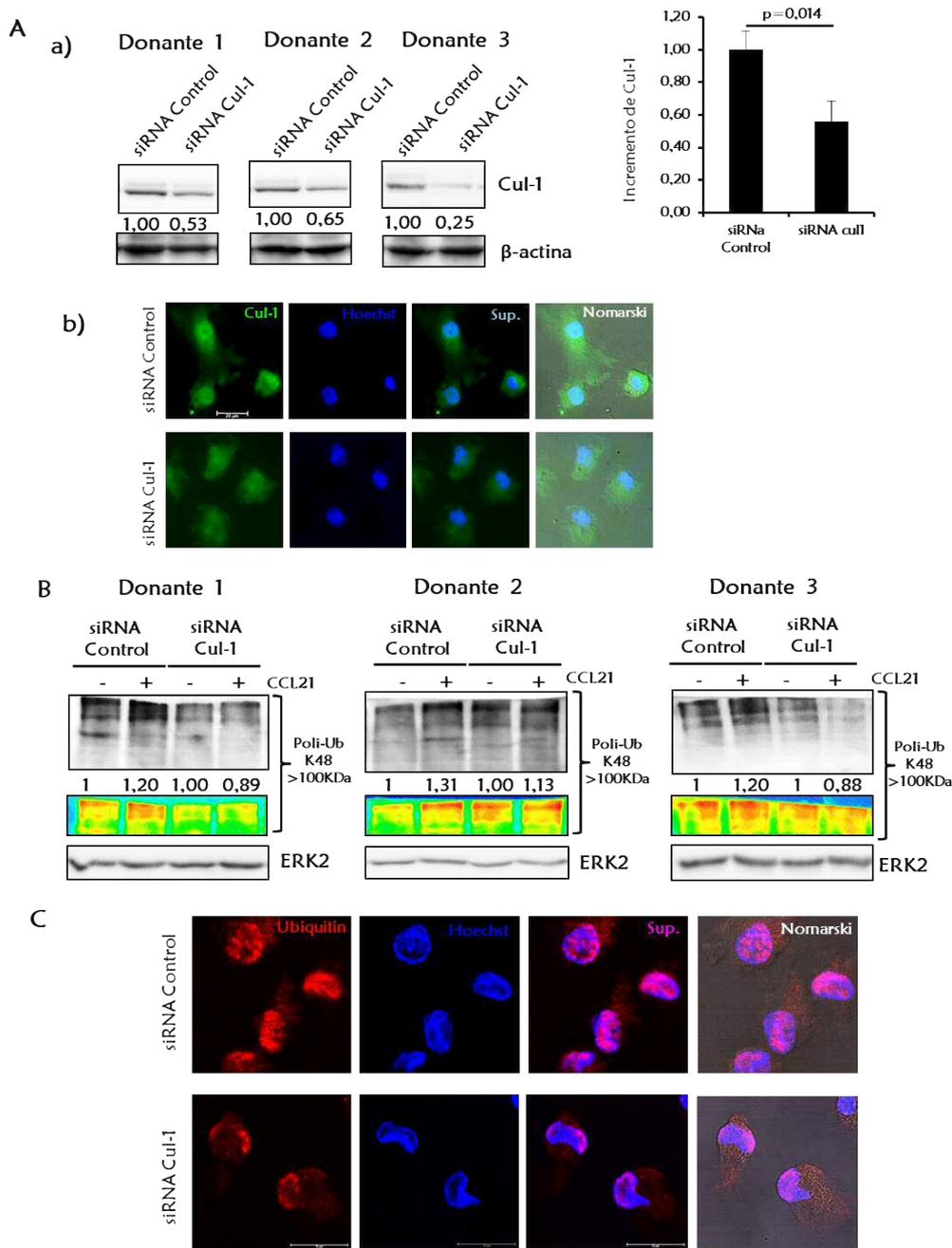


Figura 30. La reducción de los niveles de Cul-1 con un siRNA tiene los mismos efectos que MLN sobre la ubiquitinación: 5×10^5 CDs se nucleofectaron con un siRNA frente a Cul-1 (ver material y métodos). **(A)** 48h después de la nucleofección las CDs se resuspendieron en RPMI 0,1% BSA (10^6 cel/ml). **(a)** Las células del apartado (A) se lisaron y analizaron mediante SDS-PAGE seguido de WB con anticuerpos frente a Cul-1 y β -actina como control de carga. Se muestran 3 experimentos independientes en los cuales la reducción de Cul-1 fue diferente. **(b)** 5×10^5 CDs del apartado (A) se adhirieron sobre cristales recubiertos de poli-L-ornitina, después se fueron fijaron con PFA 4%, se permeabilizaron con metanol frío y se tiñeron con un anticuerpo específico frente a Cul-1. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. **(B)** 10×10^5 células del apartado A se estimularon con CCL21 (18 nM) durante 5 min a 37°C . Después las CDs se lisaron y analizaron mediante SDS-PAGE seguido de WB con anticuerpos frente a Ub-k48 y Erk2, como control de carga. Las muestras aparecen cuantificadas y estandarizadas respecto a las muestras sin estimular, a las que se asignó un valor arbitrario de 1. **(C)** 5×10^5 CDs del apartado (A) se adhirieron sobre cristales recubiertos de poli-L-ornitina, después se fueron fijaron con PFA 4%, se permeabilizaron con metanol frío y se tiñeron con un anticuerpo específico frente ubiquitina (Ub). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Las preparaciones del apartado A(b) y C fueron montadas y analizadas por microscopía confocal. Se muestra una fotografía representativa de una sección confocal (N=3).

Al analizarse los niveles de Poli-Ub-K48, se puede apreciar que la reducción de Cul-1 produjo una reducción en el efecto estimulador de CCR7 sobre la Poli-Ub-K48 (**figura 30B**), de manera similar a lo observado en los estudios con MLN.

Por último, al analizarse la ubiquitina mediante IF también se observó un resultado equivalente al obtenido con MLN, la reducción en los niveles de Cul-1 por efecto del siRNA produjo una disminución de los niveles de ubiquitina en el núcleo de las CD4s (**figura 30C**).

Los resultados mostrados, sugieren que la nedilación de Cul-1 regula la ubiquitinación de proteínas nucleares en CD4s.

6. El proteasoma se localiza próximo a SCF en el núcleo de las CD4s

El hecho de que CCR7 induzca ubiquitinación K48 en el núcleo de las CD4s sugiere que podría estar ocurriendo la degradación de proteínas en este mismo compartimento. El proteasoma 26S se ha identificado previamente en el núcleo celular (Hugle, Kleinschmidt et al. 1983; Kleinschmidt, Hugle et al. 1983; Lee and Goldberg 1998; Pines and Lindon 2005; Rockel, Stuhlmann et al. 2005; von Mikecz 2006; Carmo-Fonseca, Berciano et al. 2010; Matsuo, Kishimoto et al. 2011; Gallagher, Oeser et al. 2014). En este sentido, también analizamos la localización del proteasoma en las CD4s y si esta superestructura se encontraba cerca de SCF. Estudios de IF muestran la existencia del proteasoma (subunidad catalítica $\beta 2$ del proteasoma 20S) en el núcleo de las CD4s (**figura 31A**). También se realizaron estudios de PLA entre Cul-1 y la proteína 20S $\beta 2$. Como se puede observar en la **figura 31B**, Cul-1 y el proteasoma 20S se encuentran próximos

tanto en el núcleo como en el citoplasma de las CD_s. Estos resultados están en línea con resultados previos que muestran que SCF se asocia directamente con el proteasoma 20S (Bloom, Peschiaroli et al. 2006). Ante la posibilidad de que se encontraran interaccionando o formando parte del mismo complejo, se llevó a cabo la IP de Cul-1 y se analizó la posible interacción con 20S β2. Sin embargo, no se observó asociación entre estas proteínas (**figura 31C**).

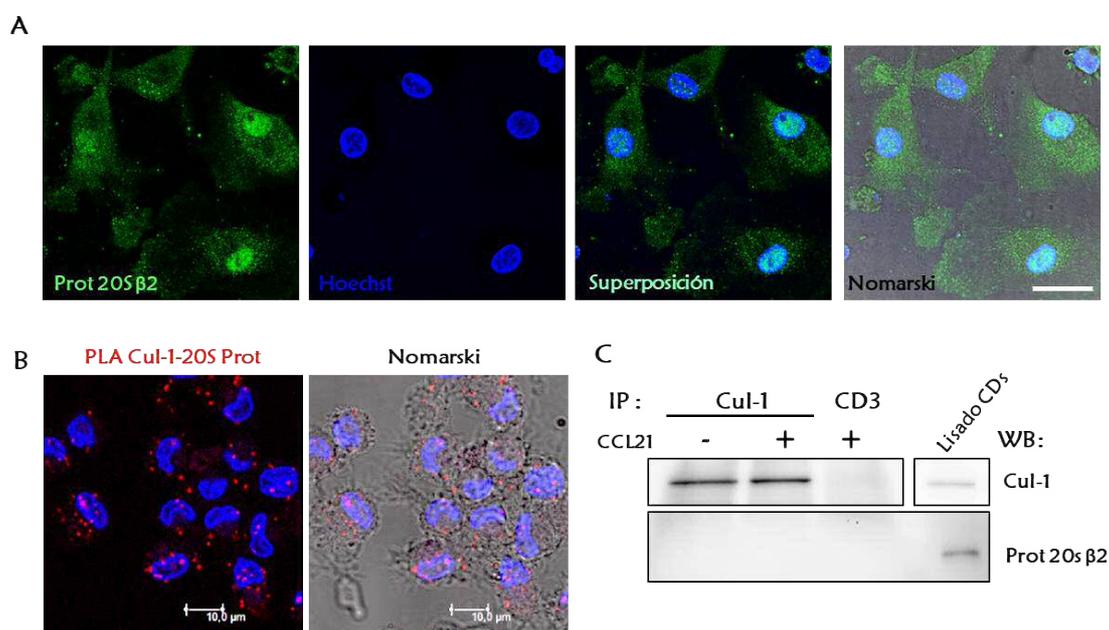


Figura 31: El proteasoma se localiza próximo a SCF en el núcleo de las CD_s (A) 5×10^4 CD_s resuspendidas en RPMI con 0,1% BSA fueron adheridas sobre cristales recubiertos de poli-L-ornitina. Las células fueron estimuladas con CCL21 (18 nM) durante 5 min. A continuación fueron fijadas con PFA 4%, permeabilizadas con metanol frío y teñidas con anticuerpos específicos frente a la subunidad β2 del proteasoma 20S. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Las preparaciones fueron montadas y analizadas por microscopía confocal. Se muestra una fotografía representativa de una sección confocal (N=2). (B) Las CD_s fueron tratadas al igual que en (A) salvo que tras la fijación y permeabilización, las células se incubaron con anticuerpos específicos frente a la subunidad β2 del proteasoma 20S y frente a Cul-1. A partir de entonces se llevó a cabo la técnica PLA (ver sección de materiales y métodos). Las preparaciones fueron montadas y analizadas por microscopía confocal. Se muestra una fotografía representativa de una sección confocal (N=2). (C) Las CD_s humanas maduras ($20\text{-}30 \times 10^6$ CD_s) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin estimular (-) o estimuladas con CCL21 (18 nM) durante 5 min (+) a 37°. Después, las células se lisaron resuspendiéndolas en buffer de lisis y se llevó a cabo la IP de Cul-1. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y WB con anticuerpos frente a Cul-1 y a la subunidad β2 del proteasoma 20S.

7. Posibles proteínas candidatas a ser ubiquitinadas bajo la estimulación de CCR7: Análisis del interactoma de Cul-1 en el núcleo de las CD8

El siguiente objetivo que nos planteamos en este estudio fue investigar qué proteínas podían ser ubiquitinadas por el complejo SCF activo en el núcleo en respuesta a la estimulación de CCR7. Esta información puede proporcionar una idea de si la ubiquitinación activada por CCR7 a través de la nedilación de Cul-1 podría estar regulando alguna función nueva para este receptor en el núcleo de las CD8.

Para intentar resolver esta pregunta, llevamos a cabo estudios de proteómica basados en espectrometría de masas. Decidimos llevar a cabo un fraccionamiento celular para obtener fracciones enriquecidas en proteínas citoplásmicas y fracciones enriquecidas en proteínas nucleares de células estimuladas con CCL21. Posteriormente inmunoprecipitamos Cul-1 de la fracción nuclear, donde se encuentra la mayor parte de Cul-1^{Nedd8}. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (MS), en el espectrómetro de masas Q-Exactive, con el objetivo de identificar las proteínas que podrían estar interactuando con Cul-1, y, por tanto, siendo reclutadas por el complejo SCF para su ubiquitinación.

En la [figura 32](#) se observa el resumen de tres experimentos de IP de Cul-1 nuclear analizados mediante LC-MS. Aunque se identificó un reducido número de proteínas, se encontraron proteínas comunes en los tres experimentos realizados

(figura 32A). De las 40 proteínas identificadas en los tres experimentos, se eliminaron 11 tras el filtrado por el repositorio de contaminantes CRAPome (Mellacheruvu, Wright et al. 2013). Posteriormente, se analizaron las posibles interacciones entre las 29 proteínas resultantes mediante la herramienta bioinformática STRING v 9.0 (www.string-db.org) (Szklarczyk, Franceschini et al. 2011). De este modo, se encontraron interacciones descritas, representadas con líneas, entre 9 de las proteínas encontradas, aunque no se encontró ninguna interacción descrita o predicha entre proteínas identificadas y Cul-1 (figura 32B). El análisis funcional de las 29 proteínas mediante el programa FunRich (Pathan, Keerthikumar et al. 2015) reveló un enriquecimiento en los procesos biológicos metabolismo de proteínas (6 proteínas, incluyendo a Cul-1) y respuesta inmune (4 proteínas) (figura 32C). Se comprobó mediante WB (figura 32D) que la IP se llevó a cabo correctamente.

Estos resultados confirman nuevamente que el complejo SCF activado en respuesta a CCR7 puede estar involucrado en el control del metabolismo de proteínas en el núcleo de las CD. Concretamente, destacamos varias proteínas involucradas en la síntesis de proteínas, como las proteínas ribosomales L27A, S5, 4X, el factor de elongación Ts mitocondrial (TSFM) y el complejo THO (ALYREF), implicado en la exportación nuclear de ARNm. Se puede encontrar más información sobre las proteínas identificadas en las tablas suplementarias incluidas en formato electrónico.

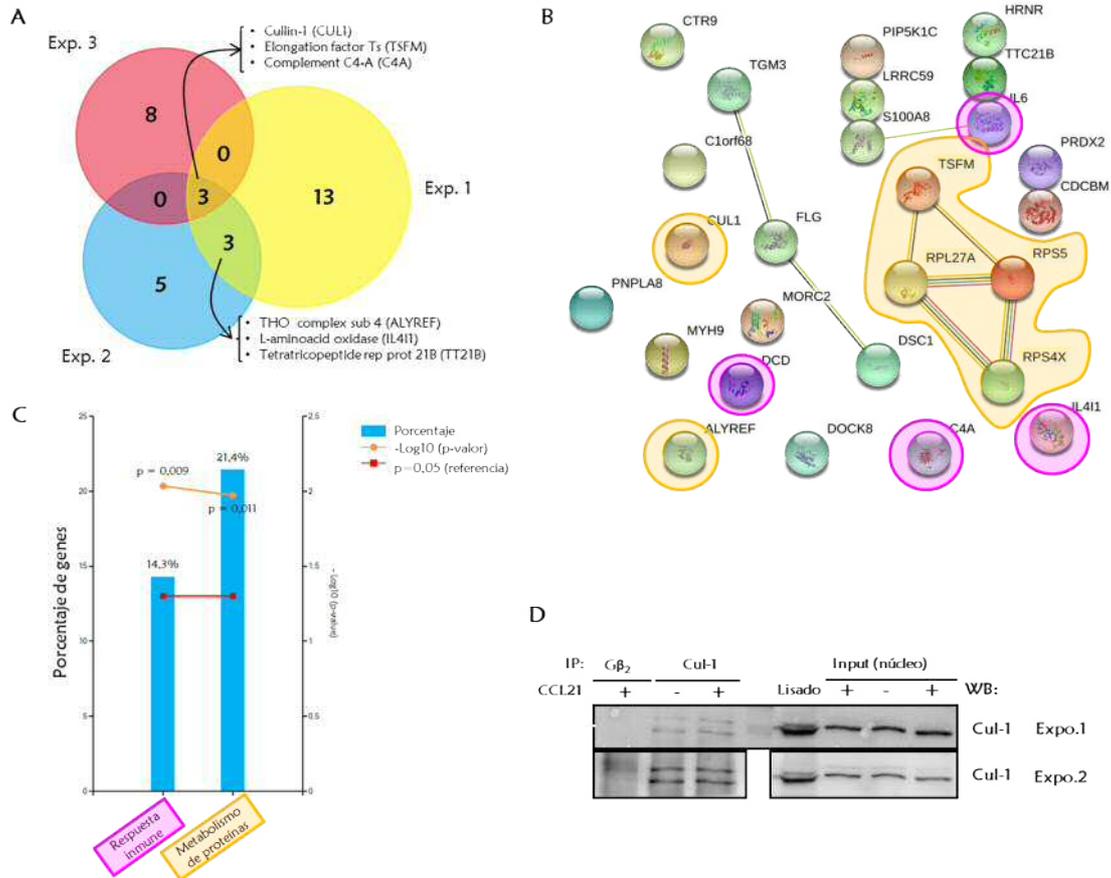


Figura 32: Estudio del interactoma de Cul-1 en el núcleo: Las CD_s (20-30 x 10⁶ CD_s) se resuspendieron en RPMI con 0,1% de BSA y se mantuvieron sin estimular (-) o estimuladas con CCL21 (18 nM) durante 5 min (+) a 37°. Después, las CD_s se lavaron en PBS frío y se llevó a cabo la extracción de proteínas citoplásmicas y la lisis de los núcleos en buffer de IP. Posteriormente se llevó a cabo la IP nuclear de Cul-1. Las muestras obtenidas fueron sometidas a una digestión con tripsina y se analizaron mediante LC-MS. **(A)** representa las proteínas obtenidas en 3 experimentos diferentes señalando las proteínas comunes a los experimentos, entre ellas, la propia Cul-1. **(B)** El análisis de las interacciones de estas proteínas mediante STRING revela interacciones conocidas entre 9 de las proteínas encontradas, pero ninguna interacción con Cul-1 descrita hasta ahora. **(C)** El análisis de los procesos biológicos en los que están implicadas estas proteínas muestra un enriquecimiento significativo en los procesos de metabolismo de proteínas (marcado en amarillo) y respuesta inmune (marcado en rosa). **(D)** Se tomaron alícuotas de las muestras de la IP para analizar la carga y comprobar que la IP se había producido correctamente mediante WB usando anticuerpos frente a Cul-1 (se muestran dos exposiciones (Expo.) de un revelado del WB). (N=3 experimentos, 9 donantes)

DISCUSIÓN

CCR7 controla múltiples funciones en las CD4 que contribuyen a una adecuada respuesta inmune adaptativa. Por ello, es importante conocer la señalización intracelular inducida por este receptor y cómo contribuye a regular las funciones celulares. La mayor parte de los estudios sobre la señalización de CCR7 se han centrado en el análisis de la fosforilación de proteínas, y los estudios centrados en otros tipos de modificaciones post-traduccionales son escasos (Schaeuble, Hauser et al. 2012). En este trabajo observamos que la estimulación de CCR7 induce nedilación de la E3 ligasa SCF en el núcleo de CD4, resultando en su activación y el consiguiente incremento de la poliubiquitinación nuclear de tipo K48.

En primer lugar, observamos que la estimulación de CCR7 produjo un aumento en la nedilación de Cul-1 (Cul-1^{nedd8}), una de las dianas de nedilación más estudiadas (Enchev, Schulman et al. 2015). Estudios previos han mostrado que la nedilación juega un importante papel en la regulación de diferentes células del sistema inmunológico, como los macrófagos, las células T y las CD4 (Chang, Reyna et al. 2012; Jin, Liao et al. 2013; Mathewson, Toubai et al. 2013; Cheng, Hu et al. 2016). Es por ello que en primer lugar estudiamos si la nedilación jugaba un papel en la señalización inducida por CCR7 en las CD4.

Hasta ahora, la mayoría de los trabajos en los que se estudia la nedilación, se centran en bloquear dicho proceso con el fármaco MLN4924 (MLN) y analizar qué efectos ejerce la inhibición sobre el funcionamiento de las células, pero

pocos estudios han analizado los cambios en nedilación producidos por la estimulación de un receptor. En relación con esto, se ha observado que la estimulación de células endoteliales microvasculares humanas con LPS induce un aumento en la nedilación de Cul-1 (Ehrentraut, Kominsky et al. 2013) y que la IL- β 1 induce nedilación de Cul-3 en fibroblastos embrionarios de ratón (Lee, Kim et al. 2012). También, se ha observado en células HEK-293 que el daño en el ADN estimula la nedilación de proteínas, como la Histona 4 y la Histona 2 y que Nedd8 se encuentra localizada en los sitios dañados del ADN (Ma, Chen et al. 2013; Li, Guan et al. 2014; Brown, Lukashchuk et al. 2015). Además, se ha observado que incluso algunos receptores pueden nedilarse, como EGFR (Oved, Mosesson et al. 2006) o CXCR5 (Renaudin, Guervilly et al. 2014). Este trabajo se muestra, por primera vez, que un receptor de quimioquinas, induce nedilación en las CDs.

Los receptores de quimioquinas señalizan al interior celular a través de las proteínas G. G α i media la señalización de la mayor parte de las rutas reguladas por CCR7 en las CDs (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005). En este sentido, nuestros estudios de inhibición con la toxina pertúsica mostraron que G α i también controla el incremento de nedilación inducido tras la estimulación de CCR7.

A continuación, investigamos si la nedilación se requería para regular las funciones que controla CCR7 en las CDs. Para este fin, empleamos el inhibidor MLN.

CCR7 induce supervivencia en las CD_s (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005; Lopez-Cotarelo, Escribano-Diaz et al. 2015), y parte este incremento de la supervivencia se debe a la activación de la ruta de NFκB (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2004; Escribano, Delgado-Martin et al. 2009). La estimulación de CCR7 induce degradación de IκBα por el proteasoma, lo que permite la traslocación de NFκB al núcleo, donde regula la expresión de genes reguladores de la supervivencia, como Bcl_{xL}. Está descrito que la nedilación de SCF regula la ruta de NFκB en diversos tipos celulares, incluyendo a las CD_s (Mathewson, Toubai et al. 2013), puesto que IκBα es una diana del complejo SCF, que regula su ubiquitinación para su posterior degradación por el proteasoma (Winston, Strack et al. 1999; Read, Brownell et al. 2000). Es por ello que nos preguntamos si la nedilación de Cul-1 inducida por CCR7, podía regular la vía de NFκB al inducir la ubiquitinación y degradación de IκBα y, de esta manera, regular la supervivencia de las CD_s.

En primer lugar, observamos que la inhibición de la nedilación mediante el tratamiento con MLN aumentó el porcentaje de apoptosis en las CD_s con respecto a las células no tratadas. Este resultado concuerda con lo observado por Cheng et al., que previamente mostraron que el tratamiento con MLN induce apoptosis de CD_s derivadas de médula ósea de ratón (Cheng, Hu et al. 2016). Puesto que la nedilación regula la supervivencia basal de las CD_s, analizamos si podría contribuir a regular la supervivencia de las CD_s tras la estimulación de CCR7. Sin embargo, observamos que en CD_s pre-tratadas con MLN, la estimulación de CCR7 aún reducía la apoptosis hasta niveles similares a los de las

células sin tratamiento con MLN, indicando que la nedilación no juega un papel en la regulación de la supervivencia inducida por CCR7 en las CD_s. Para confirmar estos resultados, analizamos directamente si la nedilación inducida por CCR7 estaba implicada en la regulación de la ruta de NFκB. Sin embargo, observamos que, en concordancia con lo observado en los experimentos de supervivencia inducida por CCR7, el tratamiento con MLN no afectó a la degradación de IκBα ni a la traslocación de NFκB al núcleo dependiente de CCR7. También observamos que, tras la estimulación de CCR7, la activación de AKT, necesaria para la activación de la vía de NFκB, tampoco estaba afectada por la inhibición de la nedilación. Por tanto, concluimos que el incremento de nedilación de Cul-1 observado tras la estimulación de CCR7 no regula la activación de la vía de NFκB, ni la supervivencia de las CD_s.

A continuación, quisimos estudiar si la nedilación jugaba algún papel en el control del resto de las funciones que se sabe que están reguladas por CCR7 en CD_s. Comenzamos analizando si la nedilación controlaba la quimiotaxis, la función clásica controlada por CCR7. Los experimentos de *transwell* mostraron que la inhibición de la nedilación no afectó a la migración de las CD_s, así como tampoco afectó a la activación de ERK1/2, un regulador clave de la quimiotaxis. Este resultado concuerda con trabajos previos que muestran que la inhibición de la nedilación no afecta a la vía de las MAP-quinasas (Mathewson, Toubai et al. 2013; Cheng, Hu et al. 2016). Por tanto, los resultados claramente indicaban que, tras la estimulación de CCR7, el incremento observado en la nedilación no está involucrado en el control de la quimiotaxis. Del mismo modo que en los

experimentos de *transwell* mencionados anteriormente, observamos que la inhibición de la nedilación tampoco afectó el al incremento de la velocidad migratoria regulada por CCR7.

También analizamos el posible papel de la nedilación en la regulación de la endocitosis inducida por CCR7 (Yanagawa and Onoe 2003). En relación a esto, observamos que la inhibición de la nedilación tampoco afectó al incremento en la endocitosis inducida por CCR7.

Como hemos mencionado, CCR7 también regula cambios en la citoarquitectura de las CDs (Yanagawa and Onoe 2002) que dependen de la inhibición, mediante fosforilación, de la proteína reguladora de actina Cofilina-1 (Torres-Bacete, Delgado-Martin et al. 2015). En este sentido, observamos, nuevamente, que la inhibición de la nedilación no afectó a los cambios en morfología, aplastamiento (*spreading*) celular, ni en la fosforilación de la Cofilina-1 en la Serina 3 inducida por la estimulación de CCR7.

Aunque estos resultados son interesantes, no aportan información acerca del significado funcional de la nedilación inducida por CCR7 en las CDs. Sin embargo, durante los experimentos de fraccionamiento de proteínas y Western blot (WB), y de inmunofluorescencias (IF) nos encontramos con un resultado interesante: A pesar de que Cul-1 total se observó repartido de manera similar entre el núcleo y citoplasma de las CDs; Nedd8 o Cul-1^{-nedd8} se encontró mayormente concentrado en el núcleo de las CDs. La presencia nuclear de proteínas modificadas por Nedd8 ya había sido observado previamente

(Kamitani, Kito et al. 1997; Furukawa, Zhang et al. 2000; Jubelin, Taieb et al. 2010; Huang, Kaufman et al. 2011; Ma, Chen et al. 2013; Enchev, Schulman et al. 2015), aunque esto no se ha investigado hasta ahora en células del sistema inmunológico. Se ha sugerido que el extremo C-terminal de Cul-1 es responsable de su traslocación al núcleo y que el bloqueo de dicha traslocación disminuye la nedilación de Cul-1 (Furukawa, Zhang et al. 2000), sugiriendo que la nedilación se produce en el núcleo. En nuestro sistema celular nos encontramos con unos niveles de nedilación basales en el núcleo de las CD4 y es allí donde aumenta la nedilación de Cul-1 en respuesta a la estimulación de CCR7. Sin embargo, se observa una disminución en los niveles de Cul-1 sin modificar en el citoplasma, tras la estimulación con CCR7, por lo que existe la posibilidad de que CCR7 esté induciendo la traslocación de Cul-1 al núcleo, donde sufre nedilación. Es necesario realizar experimentos de inhibición del transporte nuclear para averiguar si CCR7 tiene algún efecto sobre la traslocación de Cul-1.

Puesto que las proteínas Rbx1, Skp1, Cul-1 forman el núcleo invariable del complejo SCF, analizamos si estas proteínas podrían formar parte un complejo SCF nuclear. Los estudios de IF mostraron que Rbx1 tiene una distribución predominantemente nuclear, coincidiendo con la de Nedd8. Estos resultados coinciden con resultados previos que también indican una localización nuclear de Rbx1 (Wei and Sun 2010). Además, los análisis de PLA entre Cul-1 y Rbx1 sugieren que ambas moléculas se encuentran muy próximas en el interior del núcleo, aunque también se observó cercanía en el citoplasma, lo que señala la presencia de SCF tanto en el núcleo como en el citoplasma. El hecho de que la

nedilación/activación de SCF ocurra únicamente en el núcleo, plantea preguntas acerca de qué función puede estar desempeñando el complejo SCF sin nedilar en el citoplasma, o si Cul-1-Rbx1 se traslocan juntos al núcleo para activarse SCF. Se requieren futuros experimentos para resolver estas preguntas.

En cualquier caso, quisimos analizar la interacción en el núcleo entre Cul-1 y Rbx1 mediante IP nuclear de Cul-1 en CDs estimuladas o no con CCL21. En estos experimentos se observó que Rbx1 co-inmunoprecipitaba con Cul-1 en ambos casos, indicando que ambas proteínas forman parte de un mismo complejo. En su conjunto, los resultados del PLA y de la IP sugieren que ambas proteínas interaccionan en el núcleo.

En cuanto al otro componente invariable de SCF, la proteína adaptadora Skp1, los resultados de la IF muestran una distribución similar a la observada para Rbx1. Skp1 también aparece más concentrada en el núcleo de las CDs. Interesantemente, los experimentos de PLA muestran que Skp1 y Cul-1 se encuentran próximos exclusivamente en el núcleo de las CDs. Se ha descrito que cuando Cul-1 no se encuentra nedilado, su sitio de unión a Skp1-Fbox se encuentra bloqueado por la proteína Cand1; sin embargo, cuando Cul-1 se nedila, Cand1 se disocia, permitiendo la asociación de Skp1-Fbox a Cul-1 (Liu, Furukawa et al. 2002). Puesto que Cul-1^{-nedd8} se observa sólo en el núcleo, es de esperar que la señal positiva de PLA para Skp1-Cul-1 se observe sólo en el núcleo de las CDs.

A continuación, decidimos comprobar mediante inmunoprecipitación (IP) que estas moléculas interactuaban. Se inmunoprecipitó Skp1 de lisados totales de CDs estimuladas y sin estimular con CCL21 y se comprobó, mediante WB, que co-inmunoprecipitaba con Cul-1.

En resumen, podemos afirmar que Cul-1 está formando un complejo con Rbx1 y Skp1 y, por tanto, que el complejo se encuentra completo en el núcleo de las CDs. En su conjunto, los resultados previos indican que, puesto que la mayoría de Cul-1^{-nedd8} se encuentra en el núcleo, el complejo SCF se encuentra activado en el núcleo de las CDs, y por tanto puede estar induciendo la ubiquitinación de proteínas en este compartimento.

Trabajos previos han demostrado que la E3 ligasa SCF controla la ubiquitinación de proteínas de tipo K48 (Petroski and Deshaies 2005). Además, este tipo de ubiquitinación se ha observado previamente también en el núcleo (Chen, Dai et al. 2006; Suresh, Ramakrishna et al. 2010; Ferreira, Soares et al. 2015). Por tanto, en los siguientes experimentos analizamos si CCR7 podía inducir la poliubiquitinación de tipo K48 (poli-Ub-K48). Observamos que la estimulación de CCR7 dió lugar a un aumento de la poliubiquitinación en K48 en el núcleo, sobre todo de cadenas largas de poliubiquitina (de más de 5 unidades, o peso superior a 50 KDa). Además, este incremento se bloqueó cuando las CDs se pretrataron con MLN. Estos resultados indican que la estimulación de CCR7 induce poliubiquitinación-K48 de proteínas en el núcleo de las CDs, y para que este proceso ocurra, se requiere nedilación.

Cuando se realizó una IP de las proteínas ubiquitinadas totales en las CDs, se observó que la estimulación de CCR7 no indujo un aumento general en la ubiquitinación, sino que provocó un enriquecimiento en cadenas de poliubiquitina tipo K48, indicando que la ubiquitinación inducida por CCR7 es específicamente ese tipo. Además, resultados preliminares (no mostrado) indican que la estimulación de CCR7, no modifica los niveles de ubiquitinación en K63.

Cuando analizamos la ubiquitina (Ub) mediante IF comprobamos que esta proteína se encuentra muy concentrada en el núcleo de las CDs. Sin embargo, cuando las CDs se pretrataron con MLN, se observó una disminución de la Ub dentro del núcleo. Por tanto, parece que la existencia de ubiquitinación en el núcleo de las CDs depende de la nedilación. Este resultado coincide el trabajo de Hughes et al., que observan, mediante IF, una reducción en la ubiquitinación tras el tratamiento con MLN (Hughes, Wood et al. 2015).

Trabajos previos de otros grupos han mostrado que el sitio de nedilación de Cul-1 se encuentra muy próximo al sitio de unión de la enzima E2, que porta consigo la Ub y, por otro lado, que la nedilación de Cul-1 favorece la interacción de SCF con la E2 cargada (Kawakami, Chiba et al. 2001; Sakata, Yamaguchi et al. 2007). Por tanto, si el complejo SCF nedilado/activo esta ubiquitinando a las proteínas nucleares, entonces Nedd8 se localizará cerca de la Ub. En los experimentos de IF mencionados anteriormente, se observó que la Ub colocaliza en el núcleo con Nedd8, y que ambos disminuyen cuando las células son pretratadas con MLN. Al realizar experimentos de PLA entre Ub y Nedd8, observamos señal fluorescente mayormente en el núcleo de las CDs, y el tratamiento con MLN, redujo

significativamente dicha señal fluorescente. Estos resultados sugieren que existe cercanía entre Nedd8 (Cul-1^{-nedd8}) y la Ub, y que dicha cercanía depende en gran medida de que Nedd8 esté unido a Cul-1.

El tratamiento con MLN inhibe la nedilación a nivel de la E1 (NAE), por lo que no solo inhibe la nedilación de Cul-1, sino también la de otras proteínas de la familia Cullin. Para comprobar que el efecto de CCR7 sobre la ubiquitinación se debe específicamente a Cul-1, decidimos reducir los niveles de Cul-1, mediante un siRNA.

La transfección de las CDs con material genético es un proceso con una eficiencia limitada, debido a que se trata de células terminalmente diferenciadas. Se redujeron los niveles de Cul-1 en tres donantes y se analizaron los efectos del silenciamiento sobre la ubiquitinación. En dichos donantes se observó una tendencia similar a la observada con MLN sobre la Poli-Ub-K48. Tras la estimulación de las CDs con CCL21, se observó un aumento en la Poli-Ub-K48 en las CDs transfectadas con el siRNA control, que no se observó en las CDs transfectadas con el siRNA de Cul-1.

Asimismo, se analizó la localización de la Ub mediante IF y se observó que el silenciamiento de Cul-1 produjo una disminución de la Ub en el núcleo de las CDs, de manera similar a lo observado en los experimentos con MLN. Estos resultados sugieren que la ubiquitinación de proteínas inducida por CCR7 en el núcleo de las CDs depende de la nedilación de Cul-1 y activación de SCF.

La ubiquitinación de tipo K48 está asociada a la degradación de proteínas mediante el proteasoma, y numerosos trabajos en los últimos años han mostrado ubiquitinación y degradación mediada por el proteasoma en el núcleo de las células eucariotas (Hugle, Kleinschmidt et al. 1983; Kleinschmidt, Hugle et al. 1983; Lee and Goldberg 1998; Pines and Lindon 2005; Rockel, Stuhlmann et al. 2005; von Mikecz 2006; Carmo-Fonseca, Berciano et al. 2010; Matsuo, Kishimoto et al. 2011; Gallagher, Oeser et al. 2014). En el caso de las CDs, mostramos mediante inmunofluorescencia que el proteasoma también se expresa en el núcleo, usando un anticuerpo frente a la subunidad catalítica $\beta 2$, perteneciente al subcomplejo 20S del proteasoma 26S.

Además, experimentos de PLA nos permitieron observar que existe cercanía entre Cul-1 y la subunidad $\beta 2$ del proteasoma 20S, tanto en el núcleo como en el citoplasma de las CDs, lo cual sugiere que en ambos compartimentos SCF y el proteasoma están cercanos. Interesantemente, un estudio ha reportado que existe una interacción directa entre SCF y el proteasoma (Bloom, Peschiaroli et al. 2006). Sin embargo, tras la IP de Cul-1, observamos que Cul-1 no coimmunoprecipita con la subunidad $\beta 2$. El trabajo de Bloom et al. demuestra asociación entre Cul-1 y las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 6$, por lo que, es posible que la asociación entre Cul-1 y el proteasoma se dé únicamente en esas subunidades. Es por ello que es necesario analizar la co-inmunoprecipitación con dichas moléculas antes de afirmar que no existe unión entre SCF y el proteasoma 26S.

Para averiguar posibles dianas del complejo SCF y, puesto que Cul-1 es una proteína clave en este complejo, analizamos, mediante IP y proteómica, las proteínas que pudieran interactuar con Cul-1.

Realizamos tres experimentos en los que inmunoprecipitamos Cul-1 del núcleo de las CDs e identificamos las proteínas acompañantes mediante proteómica. Aunque se comprobó que Cul-1 inmunoprecipitó correctamente, se obtuvo un bajo número de proteínas, debido probablemente a que las proteínas nucleares de las CDs constituyen entre un 8-10% de las proteínas totales (datos no publicados de nuestro laboratorio) y la eficiencia de la IP puede ser muy baja. La reproducibilidad en los 3 experimentos también fue bastante baja, debido posiblemente al bajo número de proteínas obtenidas. Al analizarse las posibles interacciones entre las proteínas identificadas, no se encontraron interacciones descritas entre Cul-1 y las proteínas identificadas. Sin embargo, el estudio funcional de procesos biológicos mostró un enriquecimiento significativo en proteínas relacionadas con la respuesta inmune, aunque sin una relación descrita entre ellas, y también en proteínas relacionadas con el metabolismo proteico, con interacciones descritas entre ellas. Concretamente, se encontraron varias proteínas ribosomales, una relacionada con la elongación traduccional y otra relacionada con la exportación nuclear de ARN mensajero. Estas proteínas sugieren que Cul-1 podría estar interactuando, de algún modo, con la maquinaria de síntesis de proteínas. En este sentido, existen evidencias que indican la existencia de síntesis de proteínas en el núcleo de las células (Dahlberg, Lund et al. 2003; David, Dolan et al. 2012; Reid and Nicchitta 2012; Yewdell and David 2013) y se

sabe que durante la síntesis de proteínas se producen proteínas defectuosas o mal plegadas que deben ser eliminadas para asegurar el correcto funcionamiento de la célula (Goldberg 2003; Lelouard, Ferrand et al. 2004).

La estimulación de CCR7 induce activación de la ruta de mTORC1, cuyas dianas, S6K y 4EBP1, controlan la síntesis de proteínas (Haghighat, Mader et al. 1995; Hay and Sonenberg 2004). Por tanto, es posible que la activación por nedilación de SCF inducida por CCR7 en el núcleo de las CD_s esté implicada en el control de calidad de las proteínas sintetizadas en respuesta a CCR7. Futuros experimentos permitirán determinar si CCR7 está regulando la traducción de proceso.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis demuestran, por primera vez, que un receptor de quimioquinas regula la activación por nedilación de SCF y la consecuente ubiquitinación de proteínas en el núcleo de las CD_s. Estos resultados muestran que CCR7 está regulando una nueva función, además de las ya descritas, y aportan información sobre la regulación del UPS en el núcleo de las CD_s, un compartimiento celular muy sensible al estrés, donde la acumulación de proteínas aberrantes pueden dar lugar a toxicidad y muerte celular, y originar numerosas patologías (Shibata and Morimoto 2014). Puesto que las CD_s son fundamentales para el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa, resulta crucial comprender con precisión los mecanismos que regulan la degradación de proteínas, así como las nuevas funciones reguladas por CCR7 en estas células, ya que pueden ser utilizadas como posibles dianas terapéuticas para la modulación de la respuesta inmunológica.

En la **figura 33** se representan el modelo que incluye los resultados obtenidos en este trabajo, en conjunto con los resultados previos acerca de las funciones reguladas por CCR7 y la red de señalización controlada por este receptor en las CDs.

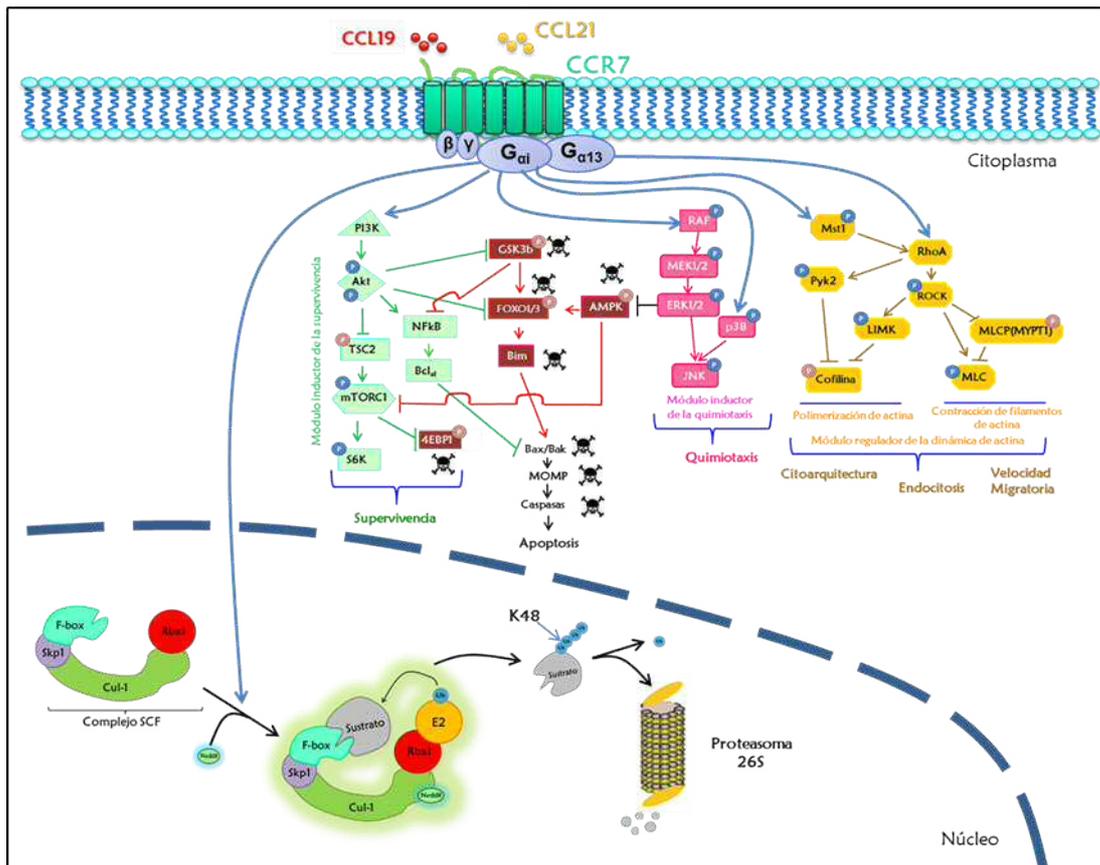


Figura 33: Modelo actualizado de la señalización intracelular activada por CCR7. La estimulación de CCR7 con sus ligandos, CCL19 y CCL21, induce un aumento de la supervivencia, la quimiotaxis, la velocidad migratoria y la endocitosis, así como cambios la citoarquitectura de las CD. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren una nueva vía de señalización en la que la estimulación de CCR7 induce la nedilación de Cul-1 en el núcleo, activando así al complejo SCF, que induce poliubiquitinación tipo K48 de proteínas nucleares, para ser degradadas posteriormente por el proteasoma nuclear.

CONCLUSIONES

- La estimulación de CCR7 induce nedilación de Cullin-1 (Cul-1) en las CD_s humanas maduras, que está mediada por la familia de proteínas G α i.
- Esta nedilación no participa en el proceso regulatorio que conduce a la quimiotaxis, el incremento de supervivencia, la velocidad migratoria, la endocitosis o los cambios en citoarquitectura inducidos por CCR7 en las CD_s.
- La nedilación de Cul-1 inducida por CCR7 se produce en el núcleo de las CD_s, donde Cul-1^{Nedd8} forma parte del complejo SCF junto con las proteínas Rbx1 y Skp1.
- La nedilación/activación de SCF inducida por CCR7 promueve ubiquitinación (K48) de proteínas nucleares en las CD_s.
- CCR7 podría controlar la degradación de proteínas mediada por el proteasoma en el núcleo de las CD_s, contribuyendo a los mecanismos de la proteostasis nuclear.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, S. J., S. E. Crown, et al. (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." Annu Rev Immunol **25**: 787-820.
- Arendt, C. S. and M. Hochstrasser (1997). "Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7156-7161.
- Bacon, K., M. Baggiolini, et al. (2002). "Chemokine/chemokine receptor nomenclature." J Interferon Cytokine Res **22**(10): 1067-1068.
- Bachmann, M. F., M. Kopf, et al. (2006). "Chemokines: more than just road signs." Nat Rev Immunol **6**(2): 159-164.
- Bardi, G., M. Lipp, et al. (2001). "The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC." Eur J Immunol **31**(11): 3291-3297.
- Bech-Otschir, D., A. Helfrich, et al. (2009). "Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome." Nat Struct Mol Biol **16**(2): 219-225.
- Bennett, E. J., J. Rush, et al. (2010). "Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics." Cell **143**(6): 951-965.
- Bhatia, S., A. C. Pavlick, et al. (2016). "A phase I study of the investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor pevonedistat (TAK-924/MLN4924) in patients with metastatic melanoma." Invest New Drugs **34**(4): 439-449.
- Bienz, M. (2006). "The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain." Trends Biochem Sci **31**(1): 35-40.
- Bloom, J., A. Peschiaroli, et al. (2006). "Modification of Cull1 regulates its association with proteasomal subunits." Cell Div **1**: 5.
- Boh, B. K., M. Y. Ng, et al. (2011). "Inhibition of cullin RING ligases by cycle inhibiting factor: evidence for interference with Nedd8-induced conformational control." J Mol Biol **413**(2): 430-437.
- Bosu, D. R. and E. T. Kipreos (2008). "Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles." Cell Div **3**: 7.
- Brown, J. S., N. Lukashchuk, et al. (2015). "Neddylation promotes ubiquitylation and release of Ku from DNA-damage sites." Cell Rep **11**(5): 704-714.
- Brownell, J. E., M. D. Sintchak, et al. (2010). "Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ." Mol Cell **37**(1): 102-111.
- Bulatov, E. and A. Ciulli (2015). "Targeting Cullin-RING E3 ubiquitin ligases for drug discovery: structure, assembly and small-molecule modulation." Biochem J **467**(3): 365-386.
- Bunting, M. D., I. Comerford, et al. (2013). "CCX-CKR deficiency alters thymic stroma impairing thymocyte development and promoting autoimmunity." Blood **121**(1): 118-128.
- Byers, M. A., P. A. Calloway, et al. (2008). "Arrestin 3 mediates endocytosis of CCR7 following ligation of CCL19 but not CCL21." J Immunol **181**(7): 4723-4732.
- Cappadocia, L. and C. D. Lima (2017). "Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism." Chem Rev.
- Carmo-Fonseca, M., M. T. Berciano, et al. (2010). "Orphan nuclear bodies." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(9): a000703.
- Cenciarelli, C., D. S. Chiaur, et al. (1999). "Identification of a family of human F-box proteins." Curr Biol **9**(20): 1177-1179.

- Coleman, K. E., M. Bekes, et al. (2017). "SENPA8 limits aberrant neddylation of NEDD8 pathway components to promote cullin-RING ubiquitin ligase function." *Elife* **6**.
- Comerford, I., Y. Harata-Lee, et al. (2013). "A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system." *Cytokine Growth Factor Rev* **24**(3): 269-283.
- Coscoy, L. and D. Ganem (2003). "PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection." *Trends Cell Biol* **13**(1): 7-12.
- Craig, K. L. and M. Tyers (1999). "The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction." *Prog Biophys Mol Biol* **72**(3): 299-328.
- Chan, Y., J. Yoon, et al. (2008). "DEN1 deneddylates non-cullin proteins in vivo." *J Cell Sci* **121**(Pt 19): 3218-3223.
- Chang, F. M., S. M. Reyna, et al. (2012). "Inhibition of neddylation represses lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in macrophage cells." *J Biol Chem* **287**(42): 35756-35767.
- Chen, Y., X. Dai, et al. (2006). "Proteasome-dependent down-regulation of activated Stat5A in the nucleus." *Blood* **108**(2): 566-574.
- Cheng, M., S. Hu, et al. (2016). "Inhibition of neddylation regulates dendritic cell functions via Deptor accumulation driven mTOR inactivation." *Oncotarget* **7**(24): 35643-35654.
- Chung, D. and G. Dellaire (2015). "The Role of the COP9 Signalosome and Neddylation in DNA Damage Signaling and Repair." *Biomolecules* **5**(4): 2388-2416.
- Dahlberg, J. E., E. Lund, et al. (2003). "Nuclear translation: what is the evidence?" *RNA* **9**(1): 1-8.
- David, A., B. P. Dolan, et al. (2012). "Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation." *J Cell Biol* **197**(1): 45-57.
- Davis, M., A. Hatzubai, et al. (2002). "Pseudosubstrate regulation of the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase by hnRNP-U." *Genes Dev* **16**(4): 439-451.
- Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." *Annu Rev Biochem* **78**: 399-434.
- Ding, Y., Y. Shimada, et al. (2003). "Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **9**(9): 3406-3412.
- Duda, D. M., L. A. Borg, et al. (2008). "Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation." *Cell* **134**(6): 995-1006.
- Duda, D. M., D. C. Scott, et al. (2011). "Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes." *Curr Opin Struct Biol* **21**(2): 257-264.
- Dudek, A. M., S. Martin, et al. (2013). "Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity." *Front Immunol* **4**: 438.
- Ehrentraut, S. F., D. J. Kominsky, et al. (2013). "Central role for endothelial human deneddylase-1/SENPA8 in fine-tuning the vascular inflammatory response." *J Immunol* **190**(1): 392-400.
- Emberley, E. D., R. Mosadeghi, et al. (2012). "Deconjugation of Nedd8 from Cull1 is directly regulated by Skp1-F-box and substrate, and the COP9 signalosome inhibits deneddylated SCF by a noncatalytic mechanism." *J Biol Chem* **287**(35): 29679-29689.
- Emmerich, C. H., A. Ordureau, et al. (2013). "Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(38): 15247-15252.

- Enchev, R. I., B. A. Schulman, et al. (2015). "Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(1): 30-44.
- Escribano, C., C. Delgado-Martin, et al. (2009). "CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3beta." *J Immunol* **183**(10): 6282-6295.
- Fang, L., V. C. Lee, et al. (2008). "CCR7 regulates B16 murine melanoma cell tumorigenesis in skin." *J Leukoc Biol* **84**(4): 965-972.
- Ferreira, J. V., A. R. Soares, et al. (2015). "K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by Chaperone-Mediated Autophagy." *Sci Rep* **5**: 10210.
- Forster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." *Cell* **99**(1): 23-33.
- Franceschi, C., S. Salvioli, et al. (2017). "Immunobiography and the Heterogeneity of Immune Responses in the Elderly: A Focus on Inflammaging and Trained Immunity." *Front Immunol* **8**: 982.
- Fredriksson, S., M. Gullberg, et al. (2002). "Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays." *Nat Biotechnol* **20**(5): 473-477.
- Frescas, D. and M. Pagano (2008). "Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer." *Nat Rev Cancer* **8**(6): 438-449.
- Furukawa, M., Y. Zhang, et al. (2000). "The CUL1 C-terminal sequence and ROC1 are required for efficient nuclear accumulation, NEDD8 modification, and ubiquitin ligase activity of CUL1." *Mol Cell Biol* **20**(21): 8185-8197.
- Gallagher, P. S., M. L. Oeser, et al. (2014). "Cellular maintenance of nuclear protein homeostasis." *Cell Mol Life Sci* **71**(10): 1865-1879.
- Geissmann, F., M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* **327**(5966): 656-661.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." *Physiol Rev* **82**(2): 373-428.
- Glotzer, M., A. W. Murray, et al. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." *Nature* **349**(6305): 132-138.
- Goldenberg, S. J., T. C. Cascio, et al. (2004). "Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases." *Cell* **119**(4): 517-528.
- Graham, G. J., M. Locati, et al. (2012). "The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors." *Immunol Lett* **145**(1-2): 30-38.
- Griffith, J. W., C. L. Sokol, et al. (2014). "Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity." *Annu Rev Immunol* **32**: 659-702.
- Groen, E. J. and T. H. Gillingwater (2015). "UBA1: At the Crossroads of Ubiquitin Homeostasis and Neurodegeneration." *Trends Mol Med* **21**(10): 622-632.
- Gunther, K., J. Leier, et al. (2005). "Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7." *Int J Cancer* **116**(5): 726-733.
- Guo, N. and Z. Peng (2013). "MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells." *Asia Pac J Clin Oncol* **9**(1): 6-11.
- Haghighat, A., S. Mader, et al. (1995). "Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E." *EMBO J* **14**(22): 5701-5709.
- Han, Y. H. and W. H. Park (2010). "MG132, a proteasome inhibitor decreased the growth of Calu-6 lung cancer cells via apoptosis and GSH depletion." *Toxicol In Vitro* **24**(4): 1237-1242.

- Handley, P. M., M. Mueckler, et al. (1991). "Molecular cloning, sequence, and tissue distribution of the human ubiquitin-activating enzyme E1." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(1): 258-262.
- Hatakeyama, S. and K. I. Nakayama (2003). "U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 635-645.
- Hatakeyama, S. and K. I. Nakayama (2003). "Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins." J Biochem **134**(1): 1-8.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.
- He, Q., P. Cheng, et al. (2005). "The COP9 signalosome regulates the Neurospora circadian clock by controlling the stability of the SCFFWD-1 complex." Genes Dev **19**(13): 1518-1531.
- Heinemeyer, W., P. C. Ramos, et al. (2004). "The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core." Cell Mol Life Sci **61**(13): 1562-1578.
- Heinzel, K., C. Benz, et al. (2007). "A silent chemokine receptor regulates steady-state leukocyte homing in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(20): 8421-8426.
- Herrmann, J., L. O. Lerman, et al. (2007). "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation." Circ Res **100**(9): 1276-1291.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.
- Hershko, A., E. Eytan, et al. (1982). "Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins." J Biol Chem **257**(23): 13964-13970.
- Hershko, A., D. Ganoth, et al. (1991). "Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts." J Biol Chem **266**(25): 16376-16379.
- Hochstrasser, M. (2009). "Origin and function of ubiquitin-like proteins." Nature **458**(7237): 422-429.
- Huang, G., A. J. Kaufman, et al. (2011). "SCCRO (DCUN1D1) promotes nuclear translocation and assembly of the neddylation E3 complex." J Biol Chem **286**(12): 10297-10304.
- Hughes, D. J., J. J. Wood, et al. (2015). "NEDDylation is essential for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency and lytic reactivation and represents a novel anti-KSHV target." PLoS Pathog **11**(3): e1004771.
- Hugle, B., J. A. Kleinschmidt, et al. (1983). "The 22 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. II. Immunological characterization and localization of their proteins in tissues and cultured cells." Eur J Cell Biol **32**(1): 157-163.
- Inobe, T. and A. Matouschek (2014). "Paradigms of protein degradation by the proteasome." Curr Opin Struct Biol **24**: 156-164.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2015). "Control of adaptive immunity by the innate immune system." Nat Immunol **16**(4): 343-353.
- Jentsch, S., W. Seufert, et al. (1991). "Genetic analysis of the ubiquitin system." Biochim Biophys Acta **1089**(2): 127-139.
- Jin, H. S., L. Liao, et al. (2013). "Neddylation pathway regulates T-cell function by targeting an adaptor protein Shc and a protein kinase Erk signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(2): 624-629.
- Jin, J., T. Cardozo, et al. (2004). "Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins." Genes Dev **18**(21): 2573-2580.
- Jin, L., A. Williamson, et al. (2008). "Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex." Cell **133**(4): 653-665.
- Jubelin, G., F. Taieb, et al. (2010). "Pathogenic bacteria target NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways." PLoS Pathog **6**(9): e1001128.

- Kamitani, T., K. Kito, et al. (1997). "Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein." *J Biol Chem* **272**(45): 28557-28562.
- Kamura, T., M. N. Conrad, et al. (1999). "The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2." *Genes Dev* **13**(22): 2928-2933.
- Kawakami, T., T. Chiba, et al. (2001). "NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase." *EMBO J* **20**(15): 4003-4012.
- Kee, Y. and J. M. Huibregtse (2007). "Regulation of catalytic activities of HECT ubiquitin ligases." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(2): 329-333.
- Kelner, G. S., J. Kennedy, et al. (1994). "Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine." *Science* **266**(5189): 1395-1399.
- Keuss, M. J., Y. Thomas, et al. (2016). "Characterization of the mammalian family of DCN-type NEDD8 E3 ligases." *J Cell Sci* **129**(7): 1441-1454.
- Kipreos, E. T., L. E. Lander, et al. (1996). "cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family." *Cell* **85**(6): 829-839.
- Kleinschmidt, J. A., B. Hugle, et al. (1983). "The 22 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. I. Biochemical and electron microscopic characterization." *Eur J Cell Biol* **32**(1): 143-156.
- Kloetzel, P. M. (2004). "The proteasome and MHC class I antigen processing." *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 225-233.
- Kohout, T. A. and R. J. Lefkowitz (2003). "Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization." *Molecular Pharmacology* **63**(1): 9-18.
- Kohout, T. A., S. L. Nicholas, et al. (2004). "Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7." *J Biol Chem* **279**(22): 23214-23222.
- Komander, D. (2009). "The emerging complexity of protein ubiquitination." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 5): 937-953.
- Konstantinova, I. M., A. S. Tsimokha, et al. (2008). "Role of proteasomes in cellular regulation." *Int Rev Cell Mol Biol* **267**: 59-124.
- Kravtsova-Ivantsiv, Y. and A. Ciechanover (2012). "Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation." *J Cell Sci* **125**(Pt 3): 539-548.
- Kristariyanto, Y. A., S. A. Abdul Rehman, et al. (2015). "K29-selective ubiquitin binding domain reveals structural basis of specificity and heterotypic nature of k29 polyubiquitin." *Mol Cell* **58**(1): 83-94.
- Krummel, M. F., F. Bartumeus, et al. (2016). "T cell migration, search strategies and mechanisms." *Nat Rev Immunol* **16**(3): 193-201.
- Kumar, S., Y. Yoshida, et al. (1993). "Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(1): 393-399.
- Kurihara, L. J., E. Semenova, et al. (2000). "Expression and functional analysis of Uch-L3 during mouse development." *Mol Cell Biol* **20**(7): 2498-2504.
- Kurz, T., Y. C. Chou, et al. (2008). "Dcn1 functions as a scaffold-type E3 ligase for cullin neddylation." *Mol Cell* **29**(1): 23-35.
- Lecker, S. H., A. L. Goldberg, et al. (2006). "Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *J Am Soc Nephrol* **17**(7): 1807-1819.
- Lee, C., S. Geng, et al. (2017). "Programming and memory dynamics of innate leukocytes during tissue homeostasis and inflammation." *J Leukoc Biol* **102**(3): 719-726.
- Lee, D. H. and A. L. Goldberg (1998). "Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists." *Trends Cell Biol* **8**(10): 397-403.

- Lee, J., H. R. Kim, et al. (2012). "Autophagy suppresses interleukin-1beta (IL-1beta) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways." *J Biol Chem* **287**(6): 4033-4040.
- Li, L., B. Liu, et al. (2013). "Neddylation pathway regulates the proliferation and survival of macrophages." *Biochem Biophys Res Commun* **432**(3): 494-498.
- Li, S., U. S. Pettersson, et al. (2014). "Interference with glycosaminoglycan-chemokine interactions with a probe to alter leukocyte recruitment and inflammation in vivo." *PLoS One* **9**(8): e104107.
- Li, T., J. Guan, et al. (2014). "RNF168-mediated H2A neddylation antagonizes ubiquitylation of H2A and regulates DNA damage repair." *J Cell Sci* **127**(Pt 10): 2238-2248.
- Li, X. and G. N. Demartino (2009). "Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin." *Biochem J* **421**(3): 397-404.
- Liakopoulos, D., G. Doenges, et al. (1998). "A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system." *EMBO J* **17**(8): 2208-2214.
- Linghu, B., J. Callis, et al. (2002). "Rub1p processing by Yuh1p is required for wild-type levels of Rub1p conjugation to Cdc53p." *Eukaryot Cell* **1**(3): 491-494.
- Linossi, E. M. and S. E. Nicholson (2012). "The SOCS box-adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation." *IUBMB Life* **64**(4): 316-323.
- Liu, J., M. Furukawa, et al. (2002). "NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120(CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases." *Mol Cell* **10**(6): 1511-1518.
- Liu, X., J. M. Reitsma, et al. (2018). "Cand1-Mediated Adaptive Exchange Mechanism Enables Variation in F-Box Protein Expression." *Mol Cell* **69**(5): 773-786 e776.
- Lopez-Cotarelo, P., C. Escribano-Diaz, et al. (2015). "A novel MEK-ERK-AMPK signaling axis controls chemokine receptor CCR7-dependent survival in human mature dendritic cells." *J Biol Chem* **290**(2): 827-840.
- Lopez-Cotarelo, P., C. Gomez-Moreira, et al. (2017). "Beyond Chemoattraction: Multifunctionality of Chemokine Receptors in Leukocytes." *Trends Immunol* **38**(12): 927-941.
- Lucas, X. and A. Ciulli (2017). "Recognition of substrate degrons by E3 ubiquitin ligases and modulation by small-molecule mimicry strategies." *Curr Opin Struct Biol* **44**: 101-110.
- Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." *N Engl J Med* **338**(7): 436-445.
- Ma, T., Y. Chen, et al. (2013). "RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination." *Mol Cell* **49**(5): 897-907.
- Maldonado, R. A. and U. H. von Andrian (2010). "How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells." *Adv Immunol* **108**: 111-165.
- Marsland, B. J., P. Battig, et al. (2005). "CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells." *Immunity* **22**(4): 493-505.
- Mashino, K., N. Sadanaga, et al. (2002). "Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma." *Cancer Res* **62**(10): 2937-2941.
- Mathewson, N., T. Toubai, et al. (2013). "Neddylation plays an important role in the regulation of murine and human dendritic cell function." *Blood* **122**(12): 2062-2073.
- Matsuo, Y., H. Kishimoto, et al. (2011). "Nuclear protein quality is regulated by the ubiquitin-proteasome system through the activity of Ubc4 and San1 in fission yeast." *J Biol Chem* **286**(15): 13775-13790.

- McCudden, C. R., M. D. Hains, et al. (2005). "G-protein signaling: back to the future." Cell Mol Life Sci **62**(5): 551-577.
- McDowell, G. S. and A. Philpott (2013). "Non-canonical ubiquitylation: mechanisms and consequences." Int J Biochem Cell Biol **45**(8): 1833-1842.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-145.
- Mellacheruvu, D., Z. Wright, et al. (2013). "The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data." Nat Methods **10**(8): 730-736.
- Mellman, I. (2013). "Dendritic cells: master regulators of the immune response." Cancer Immunol Res **1**(3): 145-149.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson, et al. (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." Nature **427**(6970): 154-159.
- Merlet, J., J. Burger, et al. (2009). "Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization." Cell Mol Life Sci **66**(11-12): 1924-1938.
- Metzger, M. B., V. A. Hristova, et al. (2012). "HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance." J Cell Sci **125**(Pt 3): 531-537.
- Metzger, M. B., J. N. Pruneda, et al. (2014). "RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination." Biochim Biophys Acta **1843**(1): 47-60.
- Meyer, H. J. and M. Rape (2014). "Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains." Cell **157**(4): 910-921.
- Morimoto, M., T. Nishida, et al. (2003). "Nedd8-modification of Cull1 is promoted by Roc1 as a Nedd8-E3 ligase and regulates its stability." Biochem Biophys Res Commun **301**(2): 392-398.
- Muller, A., E. Sonkoly, et al. (2006). "Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy." Int J Cancer **118**(9): 2147-2157.
- Murata, S., H. Yashiroda, et al. (2009). "Molecular mechanisms of proteasome assembly." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 104-115.
- Nakano, H. and M. D. Gunn (2001). "Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation." J Immunol **166**(1): 361-369.
- Nakayama, K. I. and K. Nakayama (2006). "Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer." Nat Rev Cancer **6**(5): 369-381.
- Nawrocki, S. T., P. Griffin, et al. (2012). "MLN4924: a novel first-in-class inhibitor of NEDD8-activating enzyme for cancer therapy." Expert Opin Investig Drugs **21**(10): 1563-1573.
- Nethe, M. and P. L. Hordijk (2010). "The role of ubiquitylation and degradation in RhoGTPase signalling." J Cell Sci **123**(Pt 23): 4011-4018.
- Neutzner, M. and A. Neutzner (2012). "Enzymes of ubiquitination and deubiquitination." Essays Biochem **52**: 37-50.
- Nibbs, R. J., D. S. Gilchrist, et al. (2007). "The atypical chemokine receptor D6 suppresses the development of chemically induced skin tumors." J Clin Invest **117**(7): 1884-1892.
- Nibbs, R. J. and G. J. Graham (2013). "Immune regulation by atypical chemokine receptors." Nat Rev Immunol **13**(11): 815-829.
- O'Hayre, M., C. L. Salanga, et al. (2008). "Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment." Biochem J **409**(3): 635-649.

- Ohtake, F., H. Tsuchiya, et al. (2018). "K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(7): E1401-E1408.
- Omura, S., T. Fujimoto, et al. (1991). "Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells." J Antibiot (Tokyo) **44**(1): 113-116.
- Onel, M., F. Sumbul, et al. (2017). "Cullin neddylation may allosterically tune polyubiquitin chain length and topology." Biochem J **474**(5): 781-795.
- Oved, S., Y. Mosesson, et al. (2006). "Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases." J Biol Chem **281**(31): 21640-21651.
- Paiva, C., J. C. Godbersen, et al. (2017). "Pevonedistat, a Nedd8-activating enzyme inhibitor, sensitizes neoplastic B-cells to death receptor-mediated apoptosis." Oncotarget.
- Paramore, A. and S. Frantz (2003). "Bortezomib." Nat Rev Drug Discov **2**(8): 611-612.
- Pascual, J., M. Martinez-Yamout, et al. (2000). "Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor." J Mol Biol **304**(5): 723-729.
- Pathan, M., S. Keerthikumar, et al. (2015). "FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool." Proteomics **15**(15): 2597-2601.
- Paul, S. (2008). "Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches." Bioessays **30**(11-12): 1172-1184.
- Peth, A., H. C. Besche, et al. (2009). "Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening." Mol Cell **36**(5): 794-804.
- Petroski, M. D. and R. J. Deshaies (2005). "Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 9-20.
- Petroski, M. D. and R. J. Deshaies (2005). "Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34." Cell **123**(6): 1107-1120.
- Picco, G., C. Petti, et al. (2017). "Efficacy of NEDD8 Pathway Inhibition in Preclinical Models of Poorly Differentiated, Clinically Aggressive Colorectal Cancer." J Natl Cancer Inst **109**(2).
- Pickart, C. M. and M. J. Eddins (2004). "Ubiquitin: structures, functions, mechanisms." Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 55-72.
- Pickart, C. M. and D. Fushman (2004). "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals." Curr Opin Chem Biol **8**(6): 610-616.
- Pines, J. and C. Lindon (2005). "Proteolysis: anytime, any place, anywhere?" Nat Cell Biol **7**(8): 731-735.
- Platt, C. D., J. K. Ma, et al. (2010). "Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4287-4292.
- Qiang, W., F. Sui, et al. (2017). "Proteasome inhibitor MG132 induces thyroid cancer cell apoptosis by modulating the activity of transcription factor FOXO3a." Endocrine **56**(1): 98-108.
- Qu, C., N. S. Brinck-Jensen, et al. (2014). "Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases." Int J Infect Dis **19**: 1-5.
- Rabut, G. and M. Peter (2008). "Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series." EMBO Rep **9**(10): 969-976.
- Ravid, T. and M. Hochstrasser (2008). "Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 679-690.

- Read, M. A., J. E. Brownell, et al. (2000). "Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(betaTrCP)-dependent ubiquitination of I kappa B alpha." Mol Cell Biol **20**(7): 2326-2333.
- Reid, D. W. and C. V. Nicchitta (2012). "The enduring enigma of nuclear translation." J Cell Biol **197**(1): 7-9.
- Reitsma, J. M., X. Liu, et al. (2017). "Composition and Regulation of the Cellular Repertoire of SCF Ubiquitin Ligases." Cell **171**(6): 1326-1339 e1314.
- Renaudin, X., J. H. Guervilly, et al. (2014). "Proteomic analysis reveals a FANCA-modulated neddylation pathway involved in CXCR5 membrane targeting and cell mobility." J Cell Sci **127**(Pt 16): 3546-3554.
- Rieser, E., S. M. Cordier, et al. (2013). "Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling." Trends Biochem Sci **38**(2): 94-102.
- Riol-Blanco, L., N. Sanchez-Sanchez, et al. (2005). "The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed." J Immunol **174**(7): 4070-4080.
- Rock, K. L., C. Gramm, et al. (1994). "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." Cell **78**(5): 761-771.
- Rockel, T. D., D. Stuhlmann, et al. (2005). "Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus." J Cell Sci **118**(Pt 22): 5231-5242.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-928.
- Rostene, W., P. Kitabgi, et al. (2007). "Chemokines: a new class of neuromodulator?" Nat Rev Neurosci **8**(11): 895-903.
- Sakamoto, K. M. (2002). "Ubiquitin-dependent proteolysis: its role in human diseases and the design of therapeutic strategies." Mol Genet Metab **77**(1-2): 44-56.
- Sakata, E., Y. Yamaguchi, et al. (2007). "Direct interactions between NEDD8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes upregulate cullin-based E3 ligase activity." Nat Struct Mol Biol **14**(2): 167-168.
- Sallusto, F., B. Palermo, et al. (1999). "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function." Eur J Immunol **29**(5): 1617-1625.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, et al. (2004). "Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells." Blood **104**(3): 619-625.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, et al. (2006). "The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells." J Immunol **176**(9): 5153-5159.
- Sarikas, A., T. Hartmann, et al. (2011). "The cullin protein family." Genome Biol **12**(4): 220.
- Schaeuble, K., M. A. Hauser, et al. (2012). "Ubiquitylation of the chemokine receptor CCR7 enables efficient receptor recycling and cell migration." J Cell Sci **125**(Pt 19): 4463-4474.
- Schmalzer, T. and W. Dubiel (2010). "Control of Deneddylation by the COP9 Signalosome." Subcell Biochem **54**: 57-68.
- Schmidt, M. and D. Finley (2014). "Regulation of proteasome activity in health and disease." Biochim Biophys Acta **1843**(1): 13-25.
- Schneider, M. A., J. G. Meingassner, et al. (2007). "CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells." J Exp Med **204**(4): 735-745.
- Shibata, Y. and R. I. Morimoto (2014). "How the nucleus copes with proteotoxic stress." Curr Biol **24**(10): R463-474.
- Skaar, J. R., J. K. Pagan, et al. (2013). "Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(6): 369-381.
- Skaar, J. R., J. K. Pagan, et al. (2014). "SCF ubiquitin ligase-targeted therapies." Nat Rev Drug Discov **13**(12): 889-903.

- Soderberg, O., M. Gullberg, et al. (2006). "Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation." *Nat Methods* **3**(12): 995-1000.
- Soucy, T. A., L. R. Dick, et al. (2010). "The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy." *Genes Cancer* **1**(7): 708-716.
- Soucy, T. A., P. G. Smith, et al. (2009). "An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer." *Nature* **458**(7239): 732-736.
- Soucy, T. A., P. G. Smith, et al. (2009). "Targeting NEDD8-activated cullin-RING ligases for the treatment of cancer." *Clin Cancer Res* **15**(12): 3912-3916.
- Staropoli, J. F., C. McDermott, et al. (2003). "Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity." *Neuron* **37**(5): 735-749.
- Strohmaier, H., C. H. Spruck, et al. (2001). "Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line." *Nature* **413**(6853): 316-322.
- Suresh, B., S. Ramakrishna, et al. (2010). "K48- and K63-linked polyubiquitination of deubiquitinating enzyme USP44." *Cell Biol Int* **34**(8): 799-808.
- Szklarczyk, D., A. Franceschini, et al. (2011). "The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D561-568.
- Takanami, I. (2003). "Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis." *Int J Cancer* **105**(2): 186-189.
- Takeuchi, H., A. Fujimoto, et al. (2004). "CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells." *Clin Cancer Res* **10**(7): 2351-2358.
- Tanaka, K. (2009). "The proteasome: overview of structure and functions." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**(1): 12-36.
- Tang, X., S. Orlicky, et al. (2007). "Suprafacial orientation of the SCFCdc4 dimer accommodates multiple geometries for substrate ubiquitination." *Cell* **129**(6): 1165-1176.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, et al. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." *EMBO J* **19**(1): 94-102.
- Torres-Bacete, J., C. Delgado-Martin, et al. (2015). "The Mammalian Sterile 20-like 1 Kinase Controls Selective CCR7-Dependent Functions in Human Dendritic Cells." *J Immunol* **195**(3): 973-981.
- Tu, Y., C. Chen, et al. (2012). "The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis." *Int J Clin Exp Pathol* **5**(8): 726-738.
- Ulvmar, M. H., E. Hub, et al. (2011). "Atypical chemokine receptors." *Exp Cell Res* **317**(5): 556-568.
- Valimberti, I., M. Tiberti, et al. (2015). "E2 superfamily of ubiquitin-conjugating enzymes: constitutively active or activated through phosphorylation in the catalytic cleft." *Sci Rep* **5**: 14849.
- van der Veen, A. G. and H. L. Ploegh (2012). "Ubiquitin-like proteins." *Annu Rev Biochem* **81**: 323-357.
- Vassileva, G., H. Soto, et al. (1999). "The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes." *J Exp Med* **190**(8): 1183-1188.
- Vogler, O., J. M. Barcelo, et al. (2008). "Membrane interactions of G proteins and other related proteins." *Biochim Biophys Acta* **1778**(7-8): 1640-1652.
- von Mikecz, A. (2006). "The nuclear ubiquitin-proteasome system." *J Cell Sci* **119**(Pt 10): 1977-1984.

- Wada, H., K. Kito, et al. (1998). "Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3." Biochem Biophys Res Commun **251**(3): 688-692.
- Wang, Y., Z. Luo, et al. (2015). "Targeting protein neddylation with an NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induced apoptosis or senescence in human lymphoma cells." Cancer Biol Ther **16**(3): 420-429.
- Wang, Z., P. Liu, et al. (2014). "Roles of F-box proteins in cancer." Nat Rev Cancer **14**(4): 233-247.
- Weber, M., R. Hauschild, et al. (2013). "Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients." Science **339**(6117): 328-332.
- Wee, S., R. K. Geyer, et al. (2005). "CSN facilitates Cullin-RING ubiquitin ligase function by counteracting autocatalytic adapter instability." Nat Cell Biol **7**(4): 387-391.
- Wei, D. and Y. Sun (2010). "Small RING Finger Proteins RBX1 and RBX2 of SCF E3 Ubiquitin Ligases: The Role in Cancer and as Cancer Targets." Genes Cancer **1**(7): 700-707.
- Welcker, M. and B. E. Clurman (2008). "FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation." Nat Rev Cancer **8**(2): 83-93.
- Willems, A. R., S. Lanker, et al. (1996). "Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway." Cell **86**(3): 453-463.
- Winston, J. T., D. M. Koepp, et al. (1999). "A family of mammalian F-box proteins." Curr Biol **9**(20): 1180-1182.
- Winston, J. T., P. Strack, et al. (1999). "The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and beta-catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro." Genes Dev **13**(3): 270-283.
- Wojcik, C. and G. N. DeMartino (2003). "Intracellular localization of proteasomes." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 579-589.
- Wong, K. M., L. N. Micel, et al. (2017). "Targeting the protein ubiquitination machinery in melanoma by the NEDD8-activating enzyme inhibitor pevonedistat (MLN4924)." Invest New Drugs **35**(1): 11-25.
- Yanagawa, Y. and K. Onoe (2002). "CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells." Blood **100**(6): 1948-1956.
- Yanagawa, Y. and K. Onoe (2003). "CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities." Blood **101**(12): 4923-4929.
- Yang, X., J. Zhou, et al. (2007). "Structural basis for the function of DCN-1 in protein Neddylation." J Biol Chem **282**(34): 24490-24494.
- Yewdell, J. W. and A. David (2013). "Nuclear translation for immunosurveillance." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(44): 17612-17613.
- Yi, J. J. and M. D. Ehlers (2007). "Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function." Pharmacol Rev **59**(1): 14-39.
- Yue, Y., Y. Ma, et al. (2018). "Catalytic Mechanism of the Ubiquitin-Like NEDD8 Transfer in RING E3-E2 approximately NEDD8-Target Complex from QM/MM Free Energy Simulations." J Chem Inf Model.
- Zhao, Y., M. A. Morgan, et al. (2014). "Targeting Neddylation pathways to inactivate cullin-RING ligases for anticancer therapy." Antioxid Redox Signal **21**(17): 2383-2400.
- Zhao, Y. and Y. Sun (2013). "Cullin-RING Ligases as attractive anti-cancer targets." Curr Pharm Des **19**(18): 3215-3225.
- Zheng, J., X. Yang, et al. (2002). "CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex." Mol Cell **10**(6): 1519-1526.

- Zheng, N., B. A. Schulman, et al. (2002). "Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex." *Nature* **416**(6882): 703-709.
- Zheng, N., Q. Zhou, et al. (2016). "Recent advances in SCF ubiquitin ligase complex: Clinical implications." *Biochim Biophys Acta* **1866**(1): 12-22.
- Zhou, C., S. Wee, et al. (2003). "Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p." *Mol Cell* **11**(4): 927-938.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2012). "The chemokine superfamily revisited." *Immunity* **36**(5): 705-716.

ANEXO

Publicaciones relacionadas con el trabajo de esta tesis:

- López-Cotarelo P*, **Gómez-Moreira C***, Criado-García O*, Sánchez L, Rodríguez-Fernández JL. Beyond Chemoattraction: Multifunctionality of Chemokine Receptors in Leukocytes. *Trends Immunol.* 2017 Dec;38(12):927-941. Epub 2017 Sep 19. Review. * Contributed similarly to the study.
- Torres-Bacete J, Delgado-Martín C, **Gómez-Moreira C**, Simizu S, Rodríguez-Fernández JL. The Mammalian Sterile 20-like 1 Kinase Controls Selective CCR7-Dependent Functions in Human Dendritic Cells. *J Immunol.* 2015 Aug 1; 195 (3):973-81.
- López-Cotarelo P, Escribano-Díaz C, González-Bethencourt IL, **Gómez-Moreira C**, Deguiz ML, Torres-Bacete J, Gómez-Cabañas L, Fernández-Barrera J, Delgado-Martín C, Mellado M, Regueiro JR, Miranda-Carús ME, Rodríguez-Fernández JL. A novel MEK-ERK-AMPK signaling axis controls chemokine receptor CCR7-dependent survival in human mature dendritic cells. *J Biol Chem.* 2015 Jan 9; 290 (2):827-40.

Colaboraciones

- Gómez-SanMiguel AB*, **Gomez-Moreira C***, Nieto-Bona MP, Fernández-Galaz C, Villanúa MÁ, Martín AI, López-Calderón A. Formoterol decreases muscle wasting as well as inflammation in the rat model of rheumatoid arthritis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 Jun 1; 310 (11): E925-37. *Contributed similarly to the study.
- Martín AI, Gómez-SanMiguel AB, **Gómez-Moreira C**, Villanúa MÁ, López-Calderón A. α MSH blunts endotoxin-induced MuRF1 and atrogen-1 upregulation in skeletal muscle by modulating NF- κ B and Akt/FoxO1 pathway. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:179368.
- Martín AI, Nieto-Bona MP, Castillero E, Fernández-Galaz C, López-Menduina M, Gómez-Sanmiguel AB, **Gomez-Moreira C**, Villanua MA, López-Calderon A. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam, on atrogen-1 and myogenic regulatory factors in skeletal muscle of rats injected with endotoxin. *J Physiol Pharmacol.* 2012 Dec; 63(6):649-59.