

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**IMPLICACIÓN DE LA QUINASA GSK3 EN LA
REGULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA INDUCIDA POR
EL RECEPTOR DE QUIMIOQUINAS CCR7 EN LAS
CÉLULAS DENDRÍTICAS.**

TESIS DOCTORAL

CRISTINA ESCRIBANO DÍAZ

MADRID, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN DE LA QUINASA GSK3 EN LA
REGULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA INDUCIDA POR
EL RECEPTOR DE QUIMIOQUINAS CCR7 EN LAS
CÉLULAS DENDRÍTICAS.**

Este trabajo ha sido realizado por Cristina Escribano Díaz, para optar al grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) bajo la dirección del Dr. José Luis Rodríguez Fernández entre los años 2006 y 2009.

AGRADECIMIENTOS

Por fin llegó el momento. Después de todo este tiempo, aquí estoy... intentando recordar a todas las personas que han hecho de este tortuoso camino de la ciencia un “agradable paseo”, aunque no siempre sea así. Sólo espero no olvidarme de nadie, y si lo hago, pido perdón de todo corazón.

En primer lugar quiero agradecer a Antonio que me diera la oportunidad de trabajar en su laboratorio, para mí fue una experiencia extraordinaria. En esa etapa conocí buenos científicos y mejores personas, de las que aprendí mucho de la ciencia y de la vida, y que espero continúen en mi vida durante mucho tiempo más. A mis Danis, Lucas y Rubio, que han sido como mis hermanos mayores, enseñándome gran parte de lo que sé sobre ciencia y preocupándose siempre por mí, en todos los sentidos. Quiero decirles que siempre estaré aquí para vosotros. A Barbs, que siempre estuvo a mis espaldas dispuesta a ayudar. A la alegría del laboratorio; Isa, Tere y Gel, ¡menudo trío! Muchísimas gracias por todos los buenos momentos que hemos compartido. No sé cómo lo hacéis, porque por mal que hayan estado las cosas al final siempre acabáis con una gran sonrisa, os admiro por eso y os deseo lo mejor en vuestras vidas de todo corazón. Si necesitáis algo, que sepáis que siempre podréis contar conmigo. Y en último lugar, pero no por ello menos importante, a mi “minibec”. Silvia, sabes que no sólo fuiste mi compañera sino que te has convertido en una de mis mejores amigas, te quiero mucho y espero que la distancia nunca dañe esta amistad.

Gracias a Peter Parker por acogerme en su laboratorio y por su inestimable ayuda entonces y después. Fue una experiencia inolvidable que me brindó la oportunidad de aprender, disfrutar y conocer gente maravillosa. Muchas gracias especialmente a mis compis de pasillo y mentores, Angus y Manu, perdonad si a veces fui un poco pesada, jejeje.

Agradecer a Ángel y a Miguel por sus críticas, sugerencias, etc. Compartir los seminarios con vuestros grupos me ha dado la oportunidad de aprender mucho más a lo largo de este tiempo. Por supuesto muchísimas gracias al laboratorio de Ángel al completo; a los que estuvieron (sobre todo a Rocío y a Tilman), a los que han ido llegando (Noemí, Mateo, Sonia y Carmen) y a los que siempre han estado (Ángeles, Laura y Elena). Ha sido una suerte teneros al lado, sobre todo en momentos de crisis. Muchas gracias por vuestra ayuda, vuestros consejos y por todos los momentos que hemos compartido, especialmente gracias a aquellos que han hecho las horas de la comida mucho más interesantes.

José Luis, tengo miles de razones para darte las gracias. Gracias por todo lo que me has enseñado, por los consejos que me has dado a lo largo de estos tres años, por tu comprensión y tu paciencia, por animarnos siempre aunque las cosas fueran un poco cuesta arriba... En realidad sólo quiero decirte que me siento muy afortunada por haber trabajado contigo y que no creo que hubiese podido tener un director mejor. Por cierto, no dejes que el sistema pueda contigo.

Lorena, aunque no compartimos mucho tiempo en el laboratorio me enseñaste muchas cosas y me ayudaste desde el primer momento, gracias por ello y espero que la vida te dé muchas alegrías. Rubén, eres un navarrico excepcional, muchísimas gracias por las risas que hemos compartido. Sin duda alguna estos años habrían sido mucho más aburridos sin ti.

AGRADECIMIENTOS

Ángela, tu llegada al laboratorio trajo mucha más vida, tanto que marcaste un antes y un después, al menos para mí. Cris, por mucho que te dijera nunca podría explicar lo importante que ha sido para mi tener una compañera como tú durante este tiempo. Eres una persona maravillosa, y sin duda alguna el mundo sería un lugar mejor si hubiese más gente como tú. Gracias a las dos por ser como sois, y por todos los momentos que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio. Pero sobre todo por los buenos momentos que aún están por venir. No olvidéis que siempre que necesitéis algo podréis contar conmigo.

Por supuesto, no puedo olvidarme de la gente que me ha apoyado siempre, aunque haya sido fuera del laboratorio. A los amigos de verdad; a los de toda la vida (Vero y Dalia) y a los que han ido apareciendo con el paso de los años (Susi, Laura, Rober y Davilo), os quiero chicos y espero que a pesar de la distancia aún nos queden muchos buenos momentos que compartir. A mi familia; a mi abuela, y a mis tíos y primos que han hecho mi vida mucho más divertida. Pero sobre todo a mi “nene” y a mis padres. Nene, te quiero muchísimo y estoy convencida de que con un poco más de esfuerzo podrás hacer grandes cosas en tu vida, así que no renuncies a ello por muy duro que pueda parecer a veces. Y gracias a mis padres que me han convertido en la persona que soy, para lo bueno y para lo malo, jejeje. Gracias por haber sido siempre un gran ejemplo de fortaleza, por vuestro amor y vuestro apoyo, sin vosotros nada de esto sería posible, os quiero.

David, gracias a ti tengo un lugar donde puedo sentirme simplemente feliz y completa. Ese lugar está simplemente a tu lado, sea donde sea. Por eso no puedo imaginarme pasar el resto de mi vida sin ti. A pesar del vértigo ante todos los cambios que nos esperan, estoy segura que este es sólo el principio del gran futuro que nos espera. Te quiero y te doy las gracias por compartir tu vida conmigo.

SUMMARY

Dendritic cells (DCs) are key initiators of the immune response. It has been reported that mice with short-lived DCs display impaired immune response, on the contrary, the enhancement of the survival of the DCs may cause autoimmune diseases. Despite the importance of controlling the survival of the DCs, little is known about the mechanisms that regulate DCs lifespan.

It is known that the chemokine receptor CCR7 regulates different functions on DCs through different signaling modules. CCR7-dependent chemotaxis is regulated through the MAPKs family members, while CCR7-dependent survival relies on the activation of the PI3K/Akt pathway.

We have studied the role of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in the regulation of CCR7-dependent survival. We show that GSK3 β , but not GSK3 α , behaves as a pro-apoptotic regulator in cultured monocyte-derived human DCs. We found that GSK3 is also pro-apoptotic in murine splenic DCs *in vitro*, and in lymph node DCs *in vivo*. In keeping with its pro-survival role, stimulation of CCR7 induces phosphorylation/inhibition of GSK3 β in both, human and murine DCs. This phosphorylation was mediated by the pro-survival regulator Akt1, and was independent of MAPKs, which are key regulators of chemotaxis as mention above.

Stimulation of CCR7 also regulates the localization of two transcription factors targets of Akt, NF- κ B and FOXO. Upon CCR7 stimulation pro-survival NF- κ B translocates to the nucleus and pro-apoptotic FOXO1/3 to the cytosol, resulting in DCs more resistant to apoptosis because these transcription factors control the balance between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family members.

To investigate the functional consequences of the Akt-mediated inhibition of GSK3 β in relation to the translocation of FOXO1/3 and NF- κ B, we analyzed if GSK3 β was able to modulate the localization of these transcription factors. Using pharmacological inhibitors, siRNA and a construct encoding constitutively active GSK3 β , we found that active GSK3 β fosters and hampers the translocation to the nucleus of FOXO and NF- κ B, respectively. These results suggest that, upon CCR7 stimulation, Akt-mediated phosphorylation/inhibition of GSK3 β may be required to allow the complete translocation of FOXO and NF- κ B, and that this confers an extended survival to DCs.

Finally, we tried to elucidate the mechanisms used by GSK3 β to control the activity of FOXO transcription factors. We show that GSK3 β and FOXO3 interact with each other in DCs. We speculate that this interaction could modulate FOXO3 phosphorylation and association with 14-3-3 proteins and, therefore, FOXO localization.

Together, the results presented provide new information on the mechanisms used by GSK3 β to regulate survival and suggest that this kinase may be an interesting target to modulate DC survival and the immune response.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN	
A. Apoptosis	
A.1 Características generales	7
A.2 Caspasas	8
A.3 Proteínas de la familia Bcl-2	8
A.4 Apoptosis extrínseca e intrínseca	9
B. Las Células Dendríticas	
B.1 Sistema inmune y respuesta inmunológica	10
B.2 Función inmunológica y ciclo biológico	12
B.3 Apoptosis en las células dendríticas; relevancia en la función inmunológica	13
C. Quimioquinas y sus receptores	
C.1 Quimioquinas	14
C.2 Receptores de quimioquinas	15
C.3 Proteínas G heterotriméricas	16
D. El receptor de quimioquinas CCR7 y sus ligandos, CCL19 y CCL21	
D.1 Las quimioquinas CCL19 y CCL21	18
D.2 El receptor de quimioquinas CCR7	19
D.3 Funciones reguladas por CCR7 en CDs y vías de señalización implicadas	19
E. Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la supervivencia celular	
E.1 PI3K	20
E.2 Akt	21
E.3 NF- κ B	22
E.4 FOXO	24
E.5 GSK3	25

ÍNDICE

OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	
Reactivos generales	33
Animales	34
Cultivos celulares	
1. CDs humanas derivadas de monocitos	34
2. CDs murinas de bazo	34
3. Cultivo de células Jurkat	35
<i>Western Blot</i>	35
Inmunoprecipitación	35
Fraccionamiento nuclear	36
Valoración de proteína	36
Inmunocitoquímica	36
Microscopía de fluorescencia y confocal	36
Citometría de flujo	37
Vectores de expresión, siRNAs y nucleofecciones	37
Ensayos de apoptosis	
1. Tinción con Hoechst 33342	38
2. Tinción con Anexina V-Fitc / IP	38
3. Tinción con DePsipher	38
Ensayo de apoptosis de CDs <i>in vivo</i>	
1. Inyección de CDs en ratones C57BL/6, extracción y procesamiento de los ganglios poplíteos	39
2. Microscopía multifotón y análisis de las CDs apoptóticas en los ganglios linfáticos	39
Análisis estadístico	40
RESULTADOS	
A. GSK3 es una molécula pro-apoptótica en CDs	
A.1 GSK3 es una molécula pro-apoptótica en CDs humanas <i>in vitro</i>	43
A.2 GSK3 β es la principal isoforma reguladora de la supervivencia en CDs	45

A.3	GSK3 es pro-apoptótica en CDs murinas tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>	47
B.	CCR7 regula negativamente moléculas pro-apoptóticas como GSK3β y FOXO	
B.1	CCR7 inhibe la actividad de GSK3 β sin afectar a su localización	49
B.2	CCR7 inhibe la actividad de FOXO1/3 regulando su estado de fosforilación y su localización	51
C.	CCR7 inhibe GSK3β a través de la vía de PI3K/Akt1 que regula la supervivencia de las CDs	
C.1	CCR7 regula la actividad de GSK3 β mediante una vía que implica la activación de G $_{\alpha i/\beta\gamma}$ /PI3K/Akt1	53
C.2	La inhibición de GSK3 β inducida por CCR7 es independiente de los módulos que regulan la quimiotaxis y la velocidad de las CDs	56
C.3	PKC está implicada en la inhibición de GSK3 β inducida por CCR7	58
C.4	GSK3 β no afecta a la fosforilación de Akt1 ni ERK1/2 inducida por CCR7, ni altera la expresión de CCR7 en la membrana	59
D.	CCR7 regula la expresión de miembros de la familia Bcl-2	60
E.	GSK3β regula la vía de NF-κB en CDs	
E.1	La inhibición de GSK3 altera la localización de NF- κ B regulando el nivel de I κ B	62
E.2	Los inhibidores de GSK3 producen un aumento en la expresión de Bcl-XL	66
F.	GSK3 no regula β-catenina en CDs	67
G.	GSK3β regula la actividad de FOXO en CDs	
G.1	La actividad de GSK3 β regula la localización de FOXO1/3 en CDs	69
G.2	La inhibición de GSK3 produce una disminución en la expresión de Bim	72
G.3	GSK3 β y FOXO3 interaccionan en CDs	73

ÍNDICE

H.	GSK3β activa antagoniza el efecto pro-supervivencia de Akt1 y su inhibición es necesaria para la inducción de supervivencia por CCR7	75
	DISCUSIÓN	81
	CONCLUSIONES	95
	BIBLIOGRAFÍA	99
	ANEXOS	
A.	Abreviaturas	111
B.	Publicaciones	115

INTRODUCCIÓN

A. Apoptosis

A.1 Características generales

La apoptosis es un proceso fisiológico, regulado genéticamente, que controla la muerte celular cuya ejecución es fundamental durante el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la homeostasis tisular (Prindull 1995). Su desregulación puede generar defectos durante el desarrollo, enfermedades autoinmunes, neurodegeneración o cáncer (Thompson 1995).

La apoptosis consta de diferentes fases. En la fase de iniciación los estímulos pro-apoptóticos activan la maquinaria central de la apoptosis, cuya completa activación da lugar a la aparición de los cambios morfológicos característicos de este proceso que comienzan durante la fase efectora. Estos cambios incluyen la formación de *blebs* en la membrana, disminución del tamaño celular, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y pérdida de la adherencia celular (Saraste et al. 2000). Finalmente, se produce la fase de degradación, en la cual se forman los cuerpos apoptóticos, fragmentos cerrados de membrana plasmática que contienen orgánulos celulares y restos nucleares, que son reconocidos y eliminados por células fagocíticas. Este reconocimiento es posible porque durante la apoptosis se produce un cambio en la localización de fosfatidilserina, que pasa de estar en la cara citoplasmática de la membrana a estar expuesta en la superficie, donde actúa como señal reconocida por los fagocitos (Savill et al. 2000).

La apoptosis no genera inflamación porque la formación de los cuerpos apoptóticos impide la liberación del contenido celular al exterior, eliminándose las células apoptóticas sin que se genere respuesta inmunológica. Este proceso fisiológico de muerte celular es muy distinto del de necrosis, en el cual se produce la ruptura de la membrana plasmática y la liberación del contenido celular, lo cual inicia un proceso inflamatorio necesario para la eliminación de los restos celulares (Leist et al. 2001).

La duración del proceso de apoptosis es muy variable, se ha estimado que *in vivo* oscila entre 6 y 24 horas, aunque varía dependiendo del tipo celular (Gavrieli et al. 1992). Además la apoptosis no ocurre de un modo sincrónico dentro de una población debido, principalmente, a la gran variabilidad en la fase de iniciación. Estudios de videomicroscopía de cultivos celulares muestran que los cambios morfológicos visibles se llevan a cabo en menos de 2 horas (Messam et al. 1998), aunque “el punto de no retorno” se produce antes de la aparición de estos cambios (Brunet et al. 1998). El proceso de apoptosis puede ser fácilmente infravalorado cuantitativamente (Saraste et al. 2000) como resultado de la corta escala de tiempo en la cual la apoptosis es detectable y de la asincronía, ya que sólo unas pocas células apoptóticas estarán presentes en un momento determinado.

INTRODUCCIÓN

A.2 Caspasas

Las caspasas constituyen una familia de cisteín proteasas que desempeñan un papel fundamental durante la apoptosis. Son sintetizadas como zimógenos que carecen de actividad enzimática, y requieren ser proteolizadas para su completa activación. Estos zimógenos tienen tres dominios diferentes; un prodominio, una subunidad p20 y una subunidad p10. Son necesarios dos cortes para una correcta activación, uno que separa el prodominio y otro que libera las subunidades p20 y p10. Las caspasas se clasifican en dos grupos, caspasas iniciadoras y caspasas efectoras (Earnshaw et al. 1999), en función de la longitud del prodominio.

Las caspasas iniciadoras (caspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) tienen grandes prodominios que contienen regiones de interacción con otras proteínas. Estos dominios pueden ser tipo DED (*Death Effector Domain*) o CARD (*CAspase Recruitment Domain*), ambos favorecen el reclutamiento de estas caspasas a grandes complejos moleculares, formados en respuesta a estímulos pro-apoptóticos, donde se produce su activación (Li et al. 2008). Las caspasas efectoras (caspasa-3, -6, -7), con prodominios cortos, son activadas por caspasas iniciadoras y llevan a cabo el corte de múltiples sustratos implicados en el proceso de apoptosis.

Las caspasas reconocen una secuencia tetrapeptídica específica en sus sustratos, esta especificidad constituye además la base para el diseño de inhibidores específicos de esta familia de proteasas (Nicholson 1999).

Dada la función que desarrollan estas proteasas durante la apoptosis es necesario que su actividad esté estrictamente regulada. Esta regulación se produce a distintos niveles (Li et al. 2008): (i) regulación de la transcripción, (ii) modificaciones post-traduccionales que regulan su actividad, (iii) proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs) que se unen a las caspasas inhibiendo su actividad, y (iv) miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 que bloquean la activación de las caspasas.

A.3 Proteínas de la familia Bcl-2

La familia Bcl-2 de proteínas cumple un papel esencial en la regulación de la supervivencia celular. Todas las proteínas que constituyen esta familia contienen entre una y cuatro regiones de homología diferentes denominadas dominios BH. Funcionalmente se clasifican en dos grandes grupos según sean pro-supervivencia, que actúan inhibiendo la apoptosis, o pro-apoptóticas, cuya función induce el proceso de muerte celular (Strasser 2005; Youle et al. 2008).

Los miembros pro-supervivencia de la familia Bcl-2 son Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, A1, Mcl-1 y Boo. Excepto Mcl-1 todos contienen los cuatro dominios BH, implicados en la interacción con proteínas pro-apoptóticas que resultan así inhibidas. Tienen una región transmembrana en el extremo C-terminal que determina su localización en la membrana mitocondrial externa. De acuerdo con su función anti-apoptótica, la reducción de su expresión produce un aumento en la apoptosis (Veis et al. 1993; Motoyama

et al. 1995; Opferman et al. 2003) y su sobreexpresión induce supervivencia celular frente a una amplia variedad de estímulos pro-apoptóticos (Danial et al. 2004).

Las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 se caracterizan porque su sobreexpresión induce apoptosis en respuesta a diversos estímulos y porque interaccionan con proteínas pro-supervivencia de la familia Bcl-2. Se dividen en dos grupos principales, las proteínas de tipo Bax/Bak y las proteínas que contienen sólo dominios BH3. Las proteínas de tipo Bax/Bak incluyen Bax, Bak, Bok y Bcl-XS, tienen dos o tres dominios BH y son necesarias para que se lleve a cabo la apoptosis en varios tipos celulares (Lindsten et al. 2000; Rathmell et al. 2002). Estas proteínas inducen apoptosis porque aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial, favoreciendo así la liberación al citoplasma de otras proteínas pro-apoptóticas, entre las cuales el citocromo c es una de las más estudiadas. Las proteínas de tipo BH3 incluyen Bad, Bik, Bid, Hrk, Bim, Noxa, Puma y Bmf. Se caracterizan porque todas tienen un dominio BH3. Se ha descrito que estas proteínas inducen apoptosis porque interaccionan con una elevada afinidad con los miembros pro-supervivencia de la familia Bcl-2 produciendo su inhibición (Bouillet et al. 1999; Huang et al. 2000).

En resumen, los diversos miembros de la familia Bcl-2 actúan en conjunto como un punto de control que determina si la célula sobrevive o entra en apoptosis ante un estímulo concreto, determinando el balance entre miembros pro- y anti-apoptóticos de esta familia el destino celular.

A.4 Apoptosis extrínseca e intrínseca

Existe una gran variedad de estímulos capaces de activar dos rutas principales de apoptosis: la vía extrínseca o de receptores de muerte, y la vía intrínseca o mitocondrial (Green et al. 2004). Los mecanismos de regulación y de señalización implicados en ambas vías son complejos, sin embargo ambas convergen en la activación de caspasas efectoras (Strasser et al. 2000; Jin et al. 2005). A continuación se describen ambas vías de forma muy simplificada.

La vía extrínseca se activa por receptores de muerte como Fas, el receptor de TNF o receptores TRAIL (Ashkenazi et al. 1998). La estimulación de estos receptores con sus ligandos induce oligomerización de los receptores y reclutamiento de proteínas adaptadoras, que contienen dominios de muerte, y de caspasa-8, formándose así un complejo denominado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). En este complejo se produce la activación de caspasa-8, que es la caspasa iniciadora en la vía extrínseca, seguida por la activación de caspasas efectoras como caspasa-3, -6 y -7 (Figura 1).

INTRODUCCIÓN

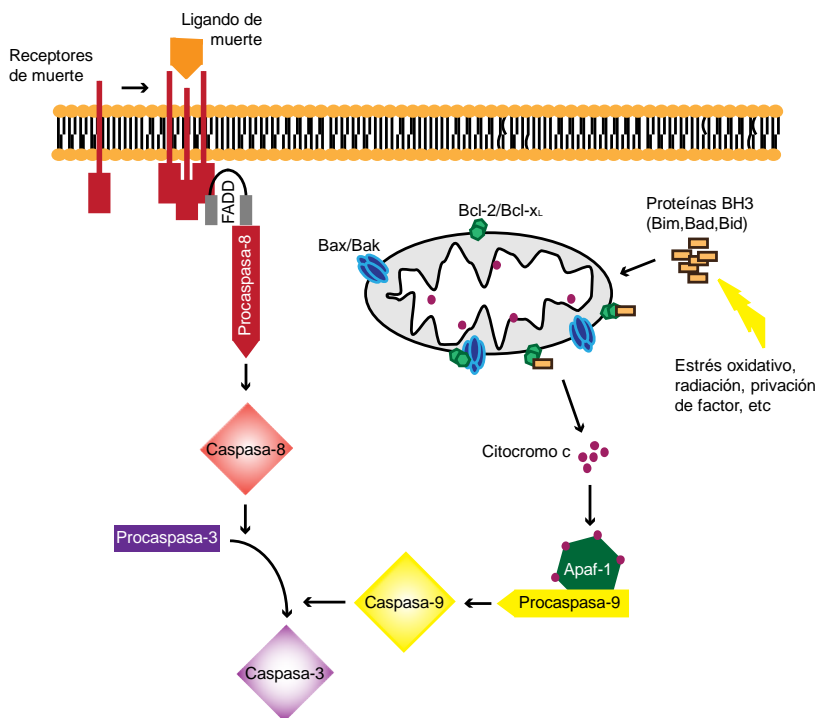


Figura 1. Modelo de las vías de señalización que median la apoptosis por vía extrínseca e intrínseca. La apoptosis a través de la vía extrínseca comienza cuando ligandos de receptores de muerte (por ejemplo, FasL) se asocian a sus receptores induciendo su oligomerización y permitiendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras con dominios de muerte y de caspasa-8, formándose un complejo denominado DISC en el que se produce la activación de la caspasa iniciadora de esta vía (caspasa-8). La apoptosis a través de la vía intrínseca puede ser activada por diversos estímulos, como privación de factores de crecimiento o estrés oxidativo, que activan miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 favoreciendo la liberación de citocromo c de la mitocondria. De este modo se forma un complejo denominado apoptosoma que contiene citocromo c, Apaf-1 y caspasa-9, en el cual se produce la activación de la caspasa iniciadora de esta vía (caspasa-9). Ambas vías convergen en la activación de caspasa-3.

La vía intrínseca puede ser activada por diversos estímulos pro-apoptóticos que convergen a nivel mitocondrial (daño en el DNA, estrés oxidativo o privación de factores de crecimiento). Estos estímulos alteran el balance entre miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 induciendo la liberación de citocromo c al citoplasma. El citocromo c interacciona con Apaf-1 (*Apoptosis Protease-inducing Factor 1*) y caspasa-9, formando un complejo denominado apoptosoma (Figura 1) en el que se produce la activación de caspasa-9, que es la caspasa iniciadora en la vía mitocondrial (Hakem et al. 1998), seguida por la activación de caspasas efectoras como caspasa-3 (Shi 2002).

B. Las Células Dendríticas

B.1 Sistema inmune y respuesta inmunológica

El sistema inmunitario está constituido por todas aquellas moléculas, células, tejidos y órganos cuya función proporciona inmunidad frente a sustancias extrañas. Para generar inmunidad los diversos componentes del sistema inmunitario actúan de manera coordinada y organizada generando lo que se denomina respuesta inmunológica, la cual puede ser de dos tipos, respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa (Fearon et al. 1996).

La inmunidad innata proporciona la primera línea de defensa frente a las infecciones y está constituida por barreras físicas y químicas presentes incluso antes de que se produzca la infección. Esto permite que este tipo de respuesta se produzca rápidamente, pero también implica que esta respuesta tiene mucha menor especificidad que la respuesta inmune adaptativa. Entre los participantes de la respuesta inmune innata se incluyen barreras físicas como los epitelios, células fagocíticas, como macrófagos o neutrófilos, y proteínas del complemento.

La inmunidad adaptativa es una respuesta más tardía y que muestra una alta especificidad frente a una infección determinada. Este tipo de inmunidad puede generar “memoria” frente a un antígeno, lo que permite responder con mayor rapidez e intensidad a exposiciones repetidas a ese antígeno (Dutton et al. 1998). Los principales componentes de este tipo de inmunidad son las células presentadoras de antígeno (CPAs), los linfocitos B y T, y productos derivados de estas células especializadas, como los anticuerpos.

Existen diferentes fases durante el curso de una respuesta inmune adaptativa (Figura 2). La inmunidad adaptativa comienza con la fase de reconocimiento antigénico, que se produce cuando una CPA, que ha captado y procesado antígenos en focos de infección, presenta estos antígenos en su superficie, donde pueden ser reconocidos por linfocitos específicos para ese antígeno (Figura 2). En la fase de activación los linfocitos que reconocen estos antígenos sufren un proceso de activación y proliferación. Estos linfocitos son los responsables de iniciar la fase efectora, en la cual se lleva a cabo la resolución de la infección. Una vez eliminado el antígeno comienza una fase de disminución de la respuesta inmune y restablecimiento de la homeostasis tisular. Durante esta última fase la apoptosis es un proceso esencial (Feig et al. 2007). Sin embargo, no todos los linfocitos sufren apoptosis al final de una respuesta inmune. Algunos de ellos permanecen en el organismo como células de memoria, permitiendo la inducción de una respuesta más rápida e intensa ante exposiciones sucesivas al mismo antígeno.

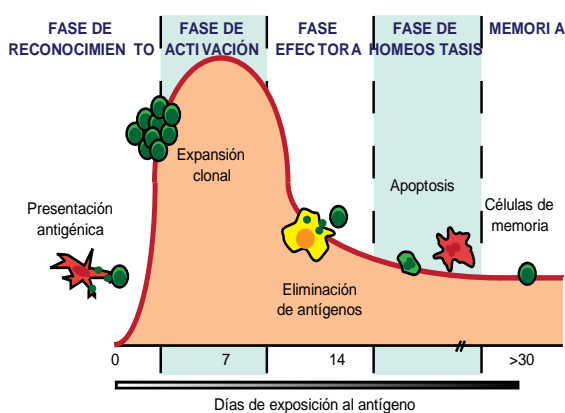


Figura 2. Fases de la respuesta inmune adaptativa. En la fase de reconocimiento se lleva a cabo la presentación antigénica, en esta fase los linfocitos reconocen los antígenos expuestos en la superficie de la CPA. La segunda fase es la de activación, en la cual los linfocitos sufren un proceso de activación y proliferación. En la fase efectora los linfocitos eliminan los antígenos. Para disminuir la respuesta inmune los linfocitos activados son eliminados por apoptosis, permitiendo el restablecimiento de la homeostasis tisular, pero no todas las células activadas sufren apoptosis, algunas sobreviven como células de memoria. El eje X representa la duración de cada fase y el eje Y la magnitud de la respuesta.

INTRODUCCIÓN

B.2 Función inmunológica y ciclo biológico

Las células dendríticas (CDs) son las CPAs más especializadas del sistema inmune. Se originan a partir de precursores derivados de médula ósea que son liberados a la sangre, donde sufren un proceso de diferenciación a CDs. Estas CDs circulantes pueden extravasarse a los tejidos periféricos, donde residen como CDs inmaduras (Figura 3). Las CDs inmaduras se caracterizan por la expresión de receptores de quimioquinas inflamatorias, que median la migración de estas CDs hacia focos de inflamación, y por tener una elevada capacidad para endocitar y procesar antígenos (Steinman 1991; Banchereau et al. 1998). Asimismo las CDs inmaduras expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40) y de MHC I y II en superficie, lo que les hace ser poco eficientes en el proceso de presentación antigénica.

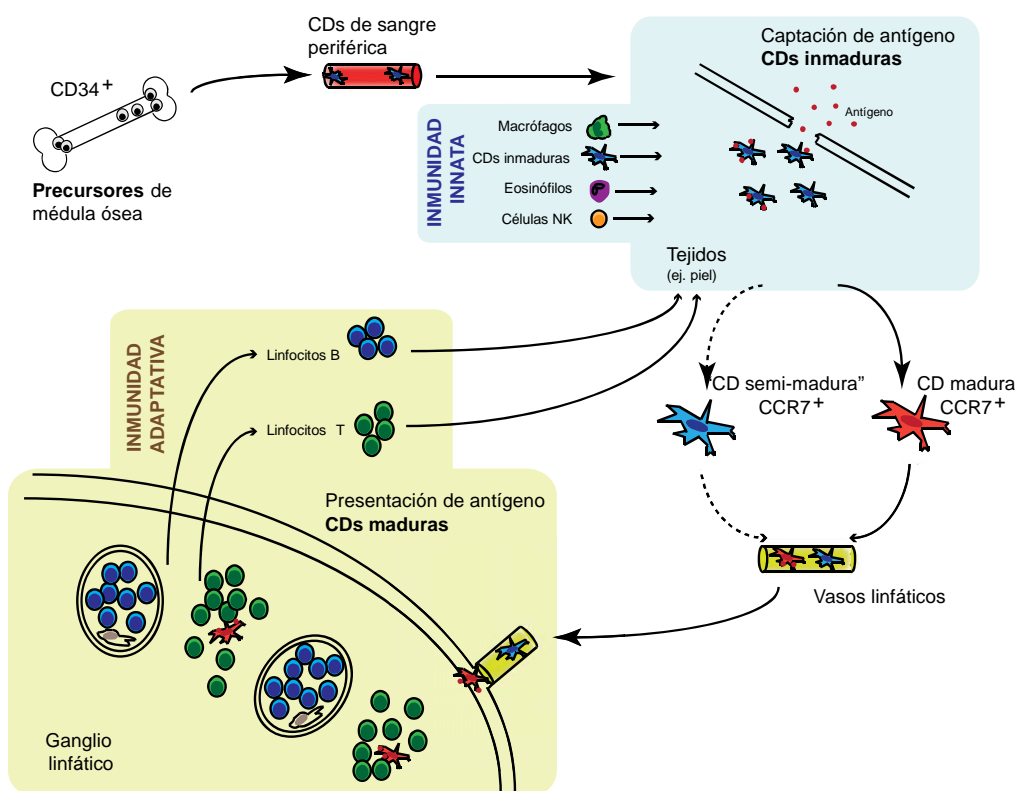


Figura 3. Ciclo biológico de las CDs. Las CDs se originan mediante un proceso de diferenciación a partir de precursores de médula ósea que pasan a la sangre. Estas CDs circulantes sufren un proceso de extravasación a tejidos periféricos, como la piel, en los que residen como CDs inmaduras que son las responsables de la captación y procesamiento de antígenos. Ante “señales de peligro”, como productos microbianos o citoquinas inflamatorias, estas CDs inmaduras sufren un proceso de maduración y migran a los ganglios linfáticos donde, como CDs maduras, llevan a cabo la presentación de los antígenos a los linfocitos T. Estos linfocitos T sufren un proceso de activación y proliferación y migran a los tejidos donde las CDs captaron los antígenos para eliminar la infección. La expresión del receptor de quimioquinas CCR7 es un paso clave durante la maduración de las CDs, ya que su expresión es lo que permite que las CDs migren hacia los ganglios linfáticos, en los cuales se encuentran sus ligandos, las quimioquinas CCL19 y CCL21.

En presencia de “señales de peligro” como productos microbianos (ej. LPS) o citoquinas inflamatorias (ej. TNF α) las CD_s inmaduras comienzan un proceso de diferenciación que dará lugar a CD_s maduras. Durante este proceso de maduración disminuye la capacidad endocítica y aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras y de MHC I y II en la superficie celular, lo que permite que las CD_s maduras sean altamente eficientes en la presentación de antígeno (Steinman 1991; Banchereau et al. 1998). Además las CD_s maduras pierden la expresión de receptores de quimioquinas inflamatorias y comienzan a expresar CCR7, lo que les permite migrar hacia los ganglios linfáticos (Dieu-Nosjean et al. 1999) y localizarse en las zonas T, donde presentan los antígenos capturados en la fase de CD inmadura a los linfocitos T (Figura 3) (Mempel et al. 2004). De este modo las células T que poseen el TCR específico para la carga antigénica de las CD_s sufrirán un proceso de activación y proliferación, seguido por la migración de estos linfocitos a los lugares de inflamación donde las CD_s capturaron los antígenos (Dudda et al. 2004).

Existe además una subpoblación de CD_s, denominadas “semi-maduras”, que expresan CCR7 y migran a los ganglios linfáticos constitutivamente (Figura 3), incluso en ausencia de inflamación. Estas CD_s activan a los linfocitos T para inducir tolerancia periférica (Steinman et al. 2002; Ohl et al. 2004).

B.3 Apoptosis en las células dendríticas; relevancia en la función inmunológica

La apoptosis es un proceso fundamental para mantener la homeostasis del sistema inmune. Mutaciones tanto en receptores de muerte celular (por ejemplo, Fas) como en sus ligandos (FasL), se han asociado al desarrollo de procesos autoinmunes como consecuencia de una excesiva activación del sistema inmune (Siegel et al. 2000). El proceso de apoptosis y su relación con la función inmune ha sido ampliamente estudiado en linfocitos debido a la alta tasa de proliferación que experimentan durante el curso de una respuesta inmune. Sin embargo, los estudios que relacionan la supervivencia de las CD_s con la respuesta inmune todavía son relativamente escasos.

La vida media de las CD_s es relativamente corta, la estimación es que las CD_s murinas de bazo son reemplazadas cada 3-4 días *in vivo* (Kamath et al. 2000; Nopora et al. 2002). Está ampliamente aceptado que las CD_s maduras mueren en su mayoría en los ganglios linfáticos en los que han cumplido su función como CPAs (Garg et al. 2003). No obstante, existen estudios recientes que muestran cómo una pequeña proporción de estas CD_s sobreviven y retornan a la circulación. Diversas evidencias muestran actualmente la importancia de mantener la supervivencia de las CD_s en un período de tiempo determinado. En este sentido ratones modificados genéticamente en los cuales la supervivencia de las CD_s se encuentra incrementada presentan, en general, una mayor activación de linfocitos T y/o B (Nopora et al. 2002; Peng et al. 2005; Chen et al. 2006; Chen et al. 2007b). En algunos casos incluso aumenta la producción de anticuerpos anti-nucleares y los ratones desarrollan síntomas de autoinmunidad (Chen et al. 2006; Chen et al. 2007b). Además ratones modificados genéticamente en los cuales aumenta la apoptosis de las

INTRODUCCIÓN

CDs muestran un defecto en la activación de la respuesta inmune adaptativa, tanto en la activación y proliferación de linfocitos T como en la producción de anticuerpos (Jung et al. 2002; Hou et al. 2004).

Resulta evidente, por tanto, que la vida media de las CDs debe estar estrechamente regulada, siendo el balance entre miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 uno de los principales reguladores de la supervivencia de las CDs maduras (Nopora et al. 2002; Chen et al. 2007a).

C. Quimioquinas y sus receptores

C.1 Quimioquinas

Las quimioquinas (*Chemokines; CHEMOtactic cytoKINES*) constituyen la mayor familia de citoquinas en el genoma humano. Son moléculas pequeñas (8-14 KDa), principalmente secretadas, que actúan como quimioatrayentes celulares mediante la activación de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) (Rollins 1997; Thelen 2001).

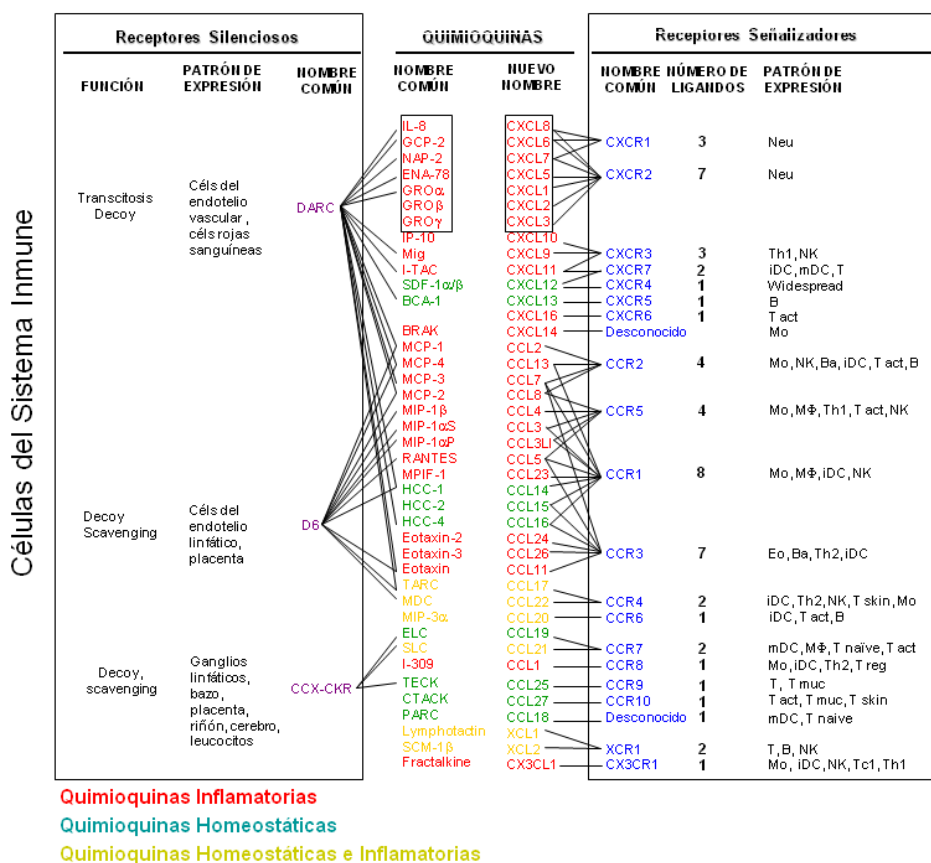


Tabla 1. Clasificación funcional de las quimioquinas y sus receptores. En esta tabla se muestran las quimioquinas clasificadas en base a su función en tres grupos: quimioquinas inflamatorias o inducibles (rojo), quimioquinas homeostáticas o constitutivas (verde) y quimioquinas que pueden actuar como inflamatorias y homeostáticas (amarillo). También se muestran los receptores para cada quimioquina y los tipos de leucocitos que expresan estos receptores.

Desde el punto de vista funcional las quimioquinas se dividen generalmente en dos grupos: *quimioquinas inflamatorias o inducibles*, que son sintetizadas en zonas de inflamación y permiten el reclutamiento de los leucocitos a estos lugares, y *quimioquinas constitutivas u homeostáticas*, responsables de la migración basal de los leucocitos y de la organización de los órganos linfoides secundarios (Cyster 1999; Sallusto et al. 2000). Aunque debe indicarse que también existen quimioquinas homeostáticas con importantes funciones en la resolución de un proceso inflamatorio (Tabla 1).

La estructura secundaria de las quimioquinas consta de un segmento amino-(N)-terminal flexible seguido de tres láminas β antiparalelas y una hélice α en el extremo carboxilo-(C)-terminal (Allen et al. 2007). En su secuencia presentan cuatro residuos de cisteína muy conservados que forman dos enlaces disulfuro (Cys1-Cys3 y Cys2-Cys4). La posición relativa de las dos primeras cisteínas permite clasificar las quimioquinas en cuatro familias (Zlotnik et al. 2000): (i) CC, en las cuales las cisteínas son adyacentes, (ii) CXC, que tienen un aminoácido no conservado entre ambas cisteínas, (iii) C, que presentan sólo dos cisteínas conservadas en lugar de cuatro, y (iv) CX₃C, con tres aminoácidos no conservados entre las dos primeras cisteínas.

C.2 Receptores de quimioquinas

Las quimioquinas ejercen su función señalizando a través de receptores específicos denominados receptores quimiotácticos, que pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). Hasta la fecha se han descrito unos 20 receptores funcionales diferentes y tres receptores que no señalizan pero cumplen funciones como “*scavenger*” (Tabla 1). Se piensa que éstos últimos ayudan a terminar las respuestas inmunes mediante la unión e internalización de quimioquinas para retirarlas del medio (Graham 2009). Cabe mencionar la gran promiscuidad que existe entre las quimioquinas y sus receptores, ya que una misma quimioquina puede activar diversos receptores y un mismo receptor puede ser activado por diferentes quimioquinas (Tabla 1).

Los GPCRs poseen el extremo N-terminal y tres *loops* en la región extracelular, siete hélices α en la región transmembrana, y el extremo C-terminal y otros tres *loops* en la región intracelular (Paterlini 2002; de Brevern et al. 2005). Existe además una secuencia muy conservada en el segundo *loop* intracelular, el motivo DRY (Aspártico, Arginina, Tirosina), que está implicada en la inducción de señales intracelulares y que no está presente en los receptores *scavenger* (Graham 2009).

Los receptores quimiotácticos se clasifican en cuatro grupos diferentes: CC, CXC, C y CX₃C, en función del tipo de quimioquina/s que unen (Zlotnik et al. 2000). Asimismo se pueden clasificar, al igual que sus ligandos (Tabla 1), en homeostáticos o inflamatorios.

INTRODUCCIÓN

Las señales generadas a través de los receptores quimiotácticos se caracterizan porque son generalmente transitorias. La activación de efectores intracelulares ocurre rápidamente tras la unión del ligando al receptor, pero a continuación disminuye la actividad del receptor produciéndose la terminación de las señales inducidas por éste. Este proceso se conoce como desensibilización del receptor y, de un modo simplificado, implica la fosforilación del receptor por GRKs (*G protein-coupled Receptor Kinases*) y/o PKCs (*Protein Kinases C*). Las GRKs inducen desensibilización específicamente en aquellos receptores que se hayan activado, desensibilización homóloga. Sin embargo, la desensibilización inducida por las PKCs se produce incluso GPCRs no activados, desensibilización heteróloga. La fosforilación de los GPCRs producida por estas quinasas favorece la asociación de moléculas denominadas arrestinas que reclutan componentes reguladores de la endocitosis mediada por clatrina, permitiendo la internalización el receptor y contribuyendo a la terminación de la señal (Claing et al. 2002).

C.3 Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas actúan como interruptores moleculares que “encienden” diversas vías de señalización intracelulares en respuesta a la activación de GPCRs por señales extracelulares. Están constituidas por una subunidad α , que se asocia a un dímero formado por una subunidad β y una γ . Las subunidades β y γ forman un dímero muy estable que sólo puede disociarse en condiciones desnaturalizantes, por lo cual $G_{\beta\gamma}$ constituye una única unidad funcional. Las proteínas G heterotriméricas se clasifican en 4 tipos en función de la subunidad α que contienen: α_s , $\alpha_{i/o}$, $\alpha_{q/11}$ y $\alpha_{12/13}$ (Cabrera-Vera et al. 2003). Se han descrito 21 subunidades α diferentes, 6 β y 12 γ . El heterotrímero $\alpha\beta\gamma$ puede estar formado por cualquier combinación de las tres. Por tanto, la expresión diferencial y la localización de las diferentes subunidades puede ser clave para la especialización en la señalización a través de los GPCRs (Robishaw et al. 2004).

En condiciones de reposo la subunidad α se encuentra inactiva porque está unida a GDP (α -GDP), y además se asocia al dímero $\beta\gamma$ inhibiéndolo (Figura 4). La unión del ligando al receptor induce un cambio conformacional que permite la activación del receptor, el cual cataliza la liberación del GDP de la subunidad α del heterotrímero que se encuentra unido al receptor permitiendo la generación de la forma activa de la subunidad α (α -GTP), que en este estado se disocia del receptor y del dímero $\beta\gamma$ (Hamm 1998). De este modo tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ quedan libres para interactuar con sus efectores (Thelen 2001; Cabrera-Vera et al. 2003) (Figura 4). La duración de la señal está determinada por la tasa de hidrólisis de GTP de la subunidad α y la consecuente re-asociación del heterotrímero inactivo α -GDP- $\beta\gamma$. Existen moléculas denominadas RGSs (*Regulators of G-protein Signaling*) que inhiben la actividad de las subunidades α mediante diversos mecanismos, uno de los cuales produce un aumento en la actividad GTPasa intrínseca de las subunidades α , acelerando la formación de α -GDP y, por tanto, la formación de un complejo inactivo α -GDP- $\beta\gamma$ (De Vries et al. 2000).

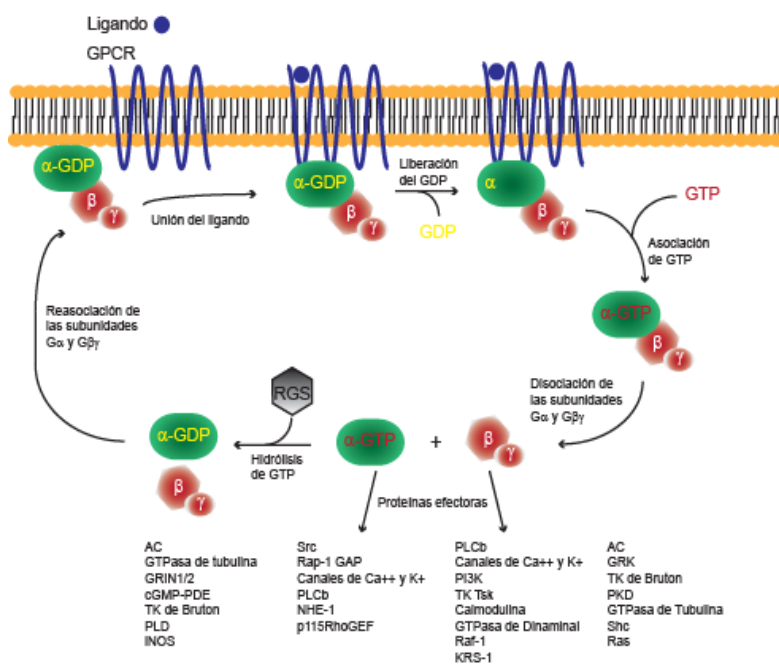


Figura 4. Ciclo de las proteínas G. Las proteínas G heterotriméricas están inhibidas en condiciones de reposo porque la subunidad α permanece en su forma inactiva (α -GDP) asociada al dímero $\beta\gamma$, que resulta así inhibido. La asociación del ligando al receptor activa el GPCR que actúa como GEF favoreciendo el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α . En su forma activa (α -GTP) la subunidad α se disocia del dímero $\beta\gamma$, que resulta así activado. La actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α convierte el GTP en GDP, generando de nuevo α -GDP que se asocia con el dímero $\beta\gamma$ inhibiéndolo. Las RGSs inhiben la actividad de las subunidades α .

En el caso de los receptores quimiotácticos se ha descrito que la quimiotaxis es inhibida por la toxina pertúsica (PTX), lo cual indica su dependencia de proteínas G heterotriméricas de la familia α_i . La PTX ADP-ribosila proteínas de la familia α_i inhibiéndolas e impidiendo su disociación del dímero $\beta\gamma$. Esto implica que se produce la inhibición tanto de la subunidad α_i como del dímero $\beta\gamma$ (Van Dop et al. 1984). Por tanto, para discriminar si son las proteínas α_i o las $\beta\gamma$ las implicadas en la regulación de una función determinada son necesarias otras estrategias como el empleo de RNA de interferencia o de construcciones como $\alpha_{\text{Transducina}}$, fosducina o $\beta\text{ARK-CT}$ que inhiben específicamente al dímero $\beta\gamma$. Estas estrategias han permitido establecer que el dímero $\beta\gamma$ está implicado en la regulación de la quimiotaxis (Arai et al. 1997; Neptune et al. 1999).

Como se mencionó anteriormente la expresión de diversos tipos de proteínas G en cada tipo celular o en cada momento de la diferenciación puede ser determinante para regular la señalización de los GPCRs en un tipo celular determinado y en un momento concreto. En este sentido es importante señalar que las CDs expresan específicamente algunos tipos concretos de subunidades α , β y γ de proteínas G (Tabla 2) (Resultados sin publicar MA Vega y AL Corbí).

INTRODUCCIÓN

Grupo	Expresión en CDs	Grupo	Expresión en CDs
Gα_{i10}		Gβ	
G α_{i11}	-	G β_1	-
G α_{i12}	++	G β_2	+++
G α_{i13}	-/+	G β_3	-
G α_{i14}	-/+	G β_4	++
G α_{i15}	-	G β_5	+/-
G α_{i16}			
Gα_{i17}		Grupo	Expresión en CDs
G α_{i18}		Gγ	
G α_{i19}		G γ_1 , G γ_{rod}	+/-
Gα_{i20}	++++	G γ_{14} , G γ_{cone}	+/-
G α_{i21}	++	G γ_2 , G γ_6	+/-
G α_{i22}	-	G γ_3	-
G α_{i23}	++	G γ_4	
Gα_{i24}		G γ_5	+++++
G α_{i25}	++++	G γ_7	
G α_{i26}	++	G γ_8 , G γ_9	
Gα_s		G γ_{10}	
G α_s	+++++	G γ_{11}	
G α_{sXL}	-	G γ_{12}	-
G α_{off}	+++	G γ_{13}	-

Tabla 2. Subunidades α , β y γ de las proteínas G expresadas en CDs maduras. (Datos sin publicar, M.A. Vega y A.L. Corbí).

D. El receptor de quimioquinas CCR7 y sus ligandos, CCL19 y CCL21

D.1 Las quimioquinas CCL19 y CCL21

Las quimioquinas son moléculas de gran importancia en la regulación del tráfico leucocitario. CCL19 y CCL21, únicos ligandos del receptor de quimioquinas CCR7, regulan la migración de algunas poblaciones de linfocitos y CDs a los ganglios linfáticos. Esto ocurre en condiciones homeostáticas, para la inducción de tolerancia periférica, y en condiciones de inflamación, para la iniciación de la respuesta inmune adaptativa.

CCL19 y CCL21 son producidas por células estromales de las zonas T de los ganglios linfáticos. CCL19 también es sintetizada por CDs humanas, lo cual puede servir como fuente adicional de este ligando, contribuyendo a mejorar la migración hacia los ganglios linfáticos. CCL21 es producida además por células endoteliales de los vasos linfáticos aferentes y, en ratón pero no en humanos, se sintetiza también en las vénulas del endotelio alto (Cyster 1999; Baekkevold et al. 2001; Carlsen et al. 2005). En ratón existen dos genes para CCL21 que generan dos formas funcionales diferentes de CCL21, CCL21-Ser, que se expresa en órganos linfoides y es equivalente a la quimioquina humana, y CCL21-Leu, que contiene un residuo de leucina en la posición 65 y se expresa en vasos linfáticos. Los ratones *plt/plt* (*Paucity of Lymph-node T cells*) tienen una delección del locus que codifica para CCL19 y CCL21-Ser, pero aún expresan CCL21-Leu (Nakano et al. 1998; Luther et al. 2000). En estos ratones la migración a los ganglios linfáticos de las CDs está considerablemente disminuida tanto en condiciones homeostáticas como inflamatorias (Gunn et al. 1999).

Existen diferencias funcionales entre CCL19 y CCL21 a pesar de que su afinidad por CCR7 es muy similar (Sullivan et al. 1999). Por ejemplo CCL19, pero no CCL21, estimula eficientemente la fosforilación e internalización de CCR7 (Kohout et al. 2004). Otra diferencia es que CCL21 interacciona con glucosaminoglicanos y otras moléculas de la superficie celular, esto es debido a que contiene una secuencia rica en aminoácidos básicos en el extremo C-terminal que no está presente en CCL19.

D.2 El receptor de quimioquinas CCR7

CCR7 forma parte de la familia de receptores quimiotácticos CC, cuyas características estructurales y mecanismos de señalización han sido explicados anteriormente. CCR7 se expresa en CD4⁺ células T maduras y semi-maduras, células B y T *naive*, timocitos en determinados estadios del desarrollo, células T reguladoras y algunos tipos de células T de memoria (Forster et al. 2008). CCR7 también se expresa en células no pertenecientes al sistema inmune, especialmente en algunas células tumorales.

Los ratones *knockout* de CCR7 presentan los siguientes defectos: (i) alteraciones en la arquitectura de los órganos linfoides, (ii) desarrollo de estructuras linfoides ectópicas, especialmente en las mucosas de órganos como pulmón e intestino, (iii) defectos en la migración hacia los ganglios linfáticos de diversas poblaciones de linfocitos T y CD4⁺, (iv) problemas en la diferenciación y maduración de timocitos, (v) retraso en la inducción de la respuesta inmune adaptativa y (vi) disminución de la tolerancia central y periférica (Forster et al. 1999).

D.3 Funciones reguladas por CCR7 en CD4⁺ y vías de señalización implicadas

El fenotipo de los ratones *knockout* de CCR7 junto con el de los ratones *plt/plt*, explicado anteriormente, demuestra la importancia de CCR7 y sus ligandos en la migración de las CD4⁺ maduras y semi-maduras hacia los ganglios linfáticos. Sin embargo, más recientemente se ha demostrado la implicación de CCR7 en la regulación de otras funciones de las CD4⁺ aparte de la quimiotaxis. Entre estas funciones se encuentran la supervivencia (Sanchez-Sanchez et al. 2004), la endocitosis (Yanagawa et al. 2003), la diferenciación (Marsland et al. 2005) y la velocidad migratoria de las CD4⁺ (Riol-Blanco et al. 2005). También se ha descrito que las moléculas señalizadoras implicadas en la regulación de cada una de estas funciones son diferentes (Riol-Blanco et al. 2005; Sanchez-Sanchez et al. 2006) (Figura 5).

La regulación de la quimiotaxis inducida por CCR7 es dependiente de proteínas G de la familia α_i y de los tres miembros de la familia de las MAPKs; ERK1/2, p38 y JNK. La velocidad migratoria está regulada por la vía Rho/Pyk2/Cofilina, cuya activación no es sensible a la inhibición por PTX, sino que está modulada por proteínas G de la familia $\alpha_{12/13}$ (Sanchez-Sanchez et al. 2006). El proceso de maduración de las CD4⁺ también puede ser inducido por la estimulación con CCL19/21. Esta regulación es inhibida con PTX, lo que demuestra que es dependiente de proteínas G heterotriméricas de la familia α_i , pero no se conocen las moléculas efectoras implicadas en este proceso

INTRODUCCIÓN

(Marsland et al. 2005). Se ha descrito también la inducción de cambios morfológicos y una mayor tasa de endocitosis en presencia de los ligandos de CCR7, lo cual también es dependiente de proteínas G de la familia α_i , aunque en este caso los efectores son Cdc42 y Rac (Yanagawa et al. 2002; Yanagawa et al. 2003). Finalmente, CCR7 puede regular la supervivencia de las CD^s mediante la activación de la ruta PI3K/Akt/NF- κ B, la cual también es dependiente de proteínas G α_i (Sanchez-Sanchez et al. 2004).

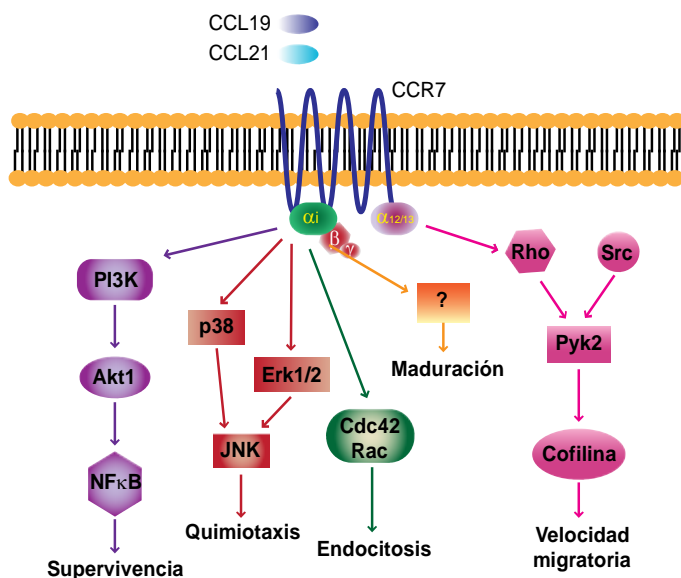


Figura 5. Funciones reguladas por CCR7 en CD^s y vías de señalización implicadas. CCR7 regula múltiples funciones en CD^s como supervivencia, quimiotaxis, velocidad migratoria, endocitosis y maduración. Cada función está regulada por vías de señalización independientes. La vía de PI3K/ Akt1/ NF- κ B regula la supervivencia pero no las demás funciones. Las MAPKs regulan específicamente la quimiotaxis, y la velocidad migratoria está regulada por Rho/ Pyk2/ Cofilina. La activación de Cdc42 y Rac es necesaria para regular la endocitosis. Se desconocen las moléculas implicadas en la regulación de la maduración.

E. Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la supervivencia celular

E.1 PI3K

Los miembros de la familia de las PI3Ks (*PhosphoInositide 3-Kinases*) están implicados en una gran variedad de procesos celulares como proliferación, supervivencia, regulación del tamaño celular, tráfico intracelular, diferenciación y motilidad. Esto hace que su desregulación esté ligada a un gran número de enfermedades como cáncer, diabetes o autoinmunidad (Katso et al. 2001). La característica común a todos los miembros de esta familia es su capacidad de fosforilar el anillo de inositol de los fosfoinosítidos (PIs) en la posición 3' OH (Hawkins et al. 1992). Las PI3Ks se clasifican en tres clases funcionales según su especificidad por el sustrato y su estructura (Foster et al. 2003).

La clase I de PI3K es la más estudiada, consta de una subunidad catalítica, p110 (α , β , γ o δ), y una subunidad reguladora. Estas enzimas pueden fosforilar PI, PI(4)P y PI(4,5)P₂, dando lugar a PI(3)P, PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃, respectivamente. Su localización es principalmente citosólica, pero tras la estimulación con diversos factores son reclutadas a la membrana, donde se encuentran sus sustratos. Esta familia de PI3Ks se clasifica en dos subgrupos: clase I_A y clase I_B. La clase I_A incluye tres isoformas de las subunidades catalíticas, que son p110 α , p110 β y p110 δ . p110 α y p110 β se expresan de forma ubicua y p110 δ está presente principalmente en leucocitos. Sus subunidades

reguladoras son miembros de la familia p85 (p85 α , p85 β y p55 γ). Estas subunidades tienen dominios SH₂ (*Src-Homology-2*) que les permiten interactuar con residuos de tirosina fosforilados y, por tanto, son activadas por tirosina quinasas. La clase I_B incluye sólo la subunidad catalítica p110 γ , que está regulada por una subunidad p101. Esta isoforma se expresa predominantemente en leucocitos y es activada por GPCRs (Murga et al. 1998; Krugmann et al. 1999). La clase II de PI3K consta de PI3K-C2 α , PI3K-C2 β y PI3K-C2 γ , las cuales están constitutivamente unidas a regiones de membrana y sus sustratos son PI y PI(4)P, pero no PI(4,5)P₂. La clase III sólo puede fosforilar el lípido PI. El único miembro de esta familia es Vps34 y su subunidad reguladora es una proteína de 150 KDa con actividad serina quinasa intrínseca, que es necesaria para la actividad de Vps34. Esta PI3K está implicada en diversos procesos de tráfico vesicular (Vanhaesebroeck et al. 1999).

Los diversos fosfolípidos generados por las PI3Ks actúan como segundos mensajeros intracelulares. Su formación proporciona nuevos sitios de unión para una gran variedad de moléculas que poseen dominios PH (*Pleckstrin Homology*), FYVE o PX (*PhoX*), los cuales pueden interactuar con estos fosfolípidos facilitando el reclutamiento de estas proteínas a la membrana. De este modo las PI3Ks pueden modular la actividad de un gran número de moléculas señalizadoras a través de la producción de PIP, PIP₂ y/o PIP₃ (Cantley 2002). En la terminación de las señales iniciadas por las PI3Ks es especialmente importante la fosfatasa PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), la cual convierte el producto de PI3K PI(3,4,5)P₃ en PI(4,5)P₂, revirtiendo el efecto de PI3K (Cantley et al. 1999). Otras fosfatasas de gran importancia son las de la familia SHIP (*SH₂-containing Inositol Phosphatase*), las cuales eliminan el fosfato de la posición 5 del PI(3,4,5)P₃ generado por PI3Ks de clase I generando PI(3,4)P₂. Al contrario que PTEN, que revierte el efecto de las PI3Ks, las fosfatasas tipo SHIP generan un nuevo mediador lipídico que puede estar implicado en la generación de nuevas señales y no tanto en la terminación de la señal activada por las PI3Ks.

Un importante efector de PI3K es la serina/treonina quinasa Akt (Manning et al. 2007), también llamada PKB (*Protein Kinase B*), la cual posee un dominio PH que permite su reclutamiento a la membrana plasmática en los lugares donde se haya activado PI3K, lo que favorece la activación de Akt.

E.2 Akt

Akt es una serina/treonina quinasa con una gran variedad de sustratos celulares implicados en diferentes procesos entre los que cabe destacar la supervivencia, la proliferación, el metabolismo celular o la migración. Existen tres isoformas de Akt: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β y Akt3/PKB γ . Todas ellas poseen un dominio PH en el extremo N-terminal, un dominio con actividad serina/treonina quinasa y un dominio regulador en el extremo C-terminal. El dominio PH de Akt une preferentemente PI(3,4,5)P₃ y PI(3,4)P₂. Además posee dos residuos específicos, uno en el dominio quinasa (Thr308) y otro en el extremo C-terminal (Ser473), que necesitan ser fosforilados para una completa activación de Akt (Franke 2008).

INTRODUCCIÓN

La activación de Akt requiere que se produzcan una serie de eventos. Primero tienen lugar la activación de PI3K y la formación de PIP₃. Esto favorece el reclutamiento a la membrana, a través de sus dominios PH, tanto de Akt como de PDK1 (*Phosphoinositide Dependent Kinase 1*). La unión del PIP₃ al dominio PH produce un cambio conformacional en Akt que expone los dos residuos que deben ser fosforilados. PDK1 es la quinasa responsable de fosforilar Akt en Thr308 (Alessi et al. 1997), y este proceso está favorecido por el reclutamiento de ambas a los mismos dominios en la membrana plasmática mediante la producción de PIP₃. El residuo del extremo C-terminal es fosforilado por el complejo TORC2 (*mTOR Complex 2*) (Sarbasov et al. 2005), produciéndose así la completa activación de Akt.

La inactivación de Akt requiere la desfosforilación de ambos residuos, Thr308 y Ser473. PHLPP (*PH domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase*) es una fosfatasa que puede eliminar el fosfato del residuo de Ser473 (Gao et al. 2005). También se ha descrito la implicación de PP2A (*Protein Phosphatase 2 A*) en la desfosforilación de Akt (Beaulieu et al. 2005).

Akt es una molécula clave en la inducción de supervivencia mediada por factores de crecimiento y otros estímulos (Marte et al. 1997), ya que muchos de los sustratos de Akt están implicados en la regulación de la apoptosis (Duronio 2008). Entre estos sustratos se encuentran caspasa-9 y BAD. Akt fosforila la caspasa-9 inhibiendo su actividad (Cardone et al. 1998). BAD es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 que forma heterodímeros con miembros pro-supervivencia de esta familia inhibiéndolos, su fosforilación por Akt genera una secuencia de unión para proteínas de la familia 14-3-3, lo cual produce la discociación de BAD de las proteínas pro-supervivencia que pueden así ejercer su función (Datta et al. 1997). Para esta tesis doctoral son de especial relevancia tres sustratos de Akt; NF-κB (*Nuclear Factor-κB*), FoxO (*Forkhead bOX class O*) y GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), que se describen más detalladamente a continuación.

E.3 NF-κB

Los factores de transcripción de la familia NF-κB (*Nuclear Factor-κB*) regulan la expresión de un gran número de genes en respuesta a infecciones, procesos inflamatorios y otras situaciones de estrés, por lo que tienen una función importante en el sistema inmune (Beinke et al. 2004). Además regulan la expresión de proteínas anti-apoptóticas (por ejemplo; IAPs, Bcl-2 y Bcl-XL) y de algunas proteínas reguladoras del ciclo celular (por ejemplo, ciclina D1). Esto resulta en un aumento de la supervivencia y la proliferación celular, por lo que estos factores de transcripción han sido implicados también en el proceso de transformación celular.

NF-κB es el nombre general que reciben factores de transcripción homo- o hetero-diméricos formados por proteínas de unión a DNA de la familia Rel. Estas proteínas se caracterizan por la presencia en su región N-terminal de un dominio RHD (*Rel Homology Domain*) responsable de la unión al DNA, la dimerización de estas

proteínas, la localización nuclear y la interacción con proteínas inhibidoras de NF- κ B (I κ B). En mamíferos se han identificado 5 proteínas de la familia Rel; NF- κ B1, NF- κ B2, c-Rel, RelA (p65) y RelB. NF- κ B1 y NF- κ B2 son sintetizados como precursores de 105 (p105) y 100 (p100) KDa, respectivamente, y su proteólisis da lugar a las formas activas, p50 y p52. Las proteínas de la familia Rel poseen diferente capacidad para activar la transcripción de sus genes diana. En este sentido sólo p65 y c-Rel tienen dominios de trans-activación que permiten activar la transcripción génica, y los dímeros de NF- κ B que no contienen p65 o c-Rel actúan como represores transcripcionales (Karin et al. 2000).

Estudios realizados con ratones *knockout* para las diferentes proteínas de la familia Rel muestran que existen distintas funciones para cada una de estas proteínas, y que sólo p65 es esencial en la regulación de la supervivencia (Ghosh et al. 1998). Los heterodímeros p65:p50 fueron los primeros identificados y los más abundantes en la mayoría de tipos celulares, por lo que el término NF- κ B es frecuentemente utilizado para referirse al dímero p65:p50.

En ausencia de un estímulo de activación, NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma mediante su interacción con proteínas inhibidoras, I κ Bs, que enmascaran la señal de localización nuclear impidiendo su transporte al núcleo (Figura 6). La presencia de estímulos activadores de NF- κ B produce una rápida fosforilación de I κ B, lo cual conlleva a su posterior ubiquitinación y degradación, dejando expuesta la señal de localización nuclear presente en NF- κ B que entonces puede trasladarse al núcleo donde regula la expresión génica (Karin et al. 2000).

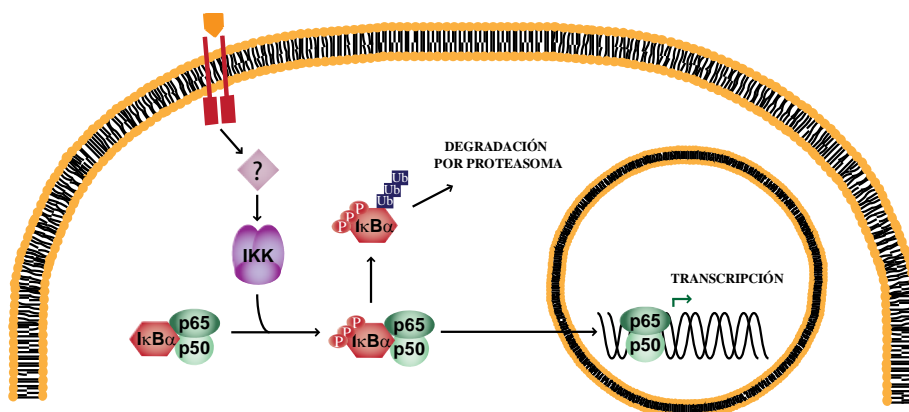


Figura 6. Modelo de activación de NF- κ B. En ausencia de un estímulo de activación NF- κ B (p65:p50) se encuentra retenido en el citoplasma mediante su asociación con I κ B. En presencia de estímulos activadores se produce la activación del complejo IKK, el cual fosforila I κ B induciendo su degradación por proteasoma. La degradación de I κ B permite que NF- κ B quede libre y pueda ser transportado al núcleo donde puede regular la transcripción de sus genes diana, muchos de los cuales ejercen funciones anti-apoptóticas.

La familia I κ B incluye diferentes proteínas; I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3 y los precursores de NF- κ B1 (p105) y NF- κ B2 (p100). Entre ellas tan sólo I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , contienen regiones reguladoras que son necesarias para su degradación inducida por un estímulo. A pesar de que se han descrito diferentes quinasas implicadas en la fosforilación de I κ B, IKK (*I*KappaB Kinase) es la principal quinasa reguladora de la vía

INTRODUCCIÓN

de activación clásica de NF- κ B (Hacker et al. 2006). IKK es un complejo formado por tres subunidades, IKK α /IKK1 e IKK β /IKK2 que poseen actividad quinasa, y una subunidad reguladora denominada IKK γ /NEMO (*NF- κ B Essential MOdulator*), que es necesaria para la activación del complejo por señales extracelulares.

En resumen, en presencia de un estímulo de activación se produce la fosforilación y activación del complejo IKK, el cual fosforila I κ B induciendo su degradación y, por tanto, dejando libre NF- κ B para que sea transportado al núcleo donde puede regular la transcripción de genes anti-apoptóticos como Bcl-XL (Chen et al. 2000) (Figura 6). Además del mecanismo de regulación descrito existen mecanismos adicionales de control del nivel de actividad y la duración de la activación de NF- κ B, entre los cuales se encuentran la re-síntesis de I κ B, fosforilaciones de NF- κ B capaces de modular su actividad, la hiperfosforilación de IKK que conduce a su inactivación, o el procesamiento de los precursores de NF- κ B (Karin et al. 2000).

E.4 FoxO

Los factores de transcripción de la familia FoxO (*Forkhead bOX O*) regulan la expresión de genes implicados en un gran número de procesos celulares como apoptosis, ciclo celular, reparación de DNA, estrés oxidativo, diferenciación celular o metabolismo de glucosa. En lo concerniente a esta tesis doctoral nos centraremos en el papel ejercido por estos factores de transcripción en el proceso de apoptosis. En este contexto se ha descrito que FoxO es capaz de transactivar factores implicados en apoptosis tanto por vía extrínseca (por ejemplo FasL) (Brunet et al. 1999), como por vía intrínseca (por ejemplo Bim) (Dijkers et al. 2000). En mamíferos esta familia está constituida por FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHRL1), FoxO4 (AFX) y FoxO6. Los miembros de esta familia se caracterizan porque contienen un dominio FKH (*ForkHead*) de unión a DNA y por la presencia de tres secuencias consenso de Akt [RXRXXX(S/T)] (Huang et al. 2007; van der Horst et al. 2007).

Existen múltiples mecanismos de regulación de la actividad de FoxO, muchos de los cuales se basan en regular la localización. Por ejemplo, la vía de PI3K/Akt resulta en la inhibición de la actividad transcripcional de FoxO induciendo su traslocación al citoplasma. Cuando se activa Akt, ésta se trasloca al núcleo y fosforila tres residuos altamente conservados en todos los miembros de la familia FoxO (T24, S256 y S319 en FoxO1), generando sitios de unión para las proteínas 14-3-3 (Brunet et al. 1999; Brunet et al. 2002). Estas proteínas se unen a FoxO en el núcleo y posteriormente se produce su exportación al citoplasma. Dado que la unión de las 14-3-3 enmascara la señal de localización nuclear de FoxO, éste permanece retenido en el citoplasma donde no puede regular la expresión génica (Figura 7). Otras quinasas como SGK, IKK, DYRK o CDK2 también fosforilan diversos miembros de la familia FoxO inhibiendo su actividad. Por el contrario, en condiciones de estrés se activan quinasas como JNK o MST1 capaces de inducir la actividad de FoxO, ya que estimulan la disociación de FoxO de las 14-3-3 facilitando su transporte al núcleo (Huang et al. 2007; van der Horst et al. 2007).

La actividad de FoxO puede ser regulada también mediante interacción con represores o activadores transcripcionales. Un ejemplo es su regulación por β -catenina, que puede interaccionar con FoxO y aumentar su actividad transcripcional (Essers et al. 2005). Mencionar simplemente que existen otros mecanismos de regulación adicionales como, por ejemplo, la acetilación o la ubiquitinación de FoxO (van der Horst et al. 2007).

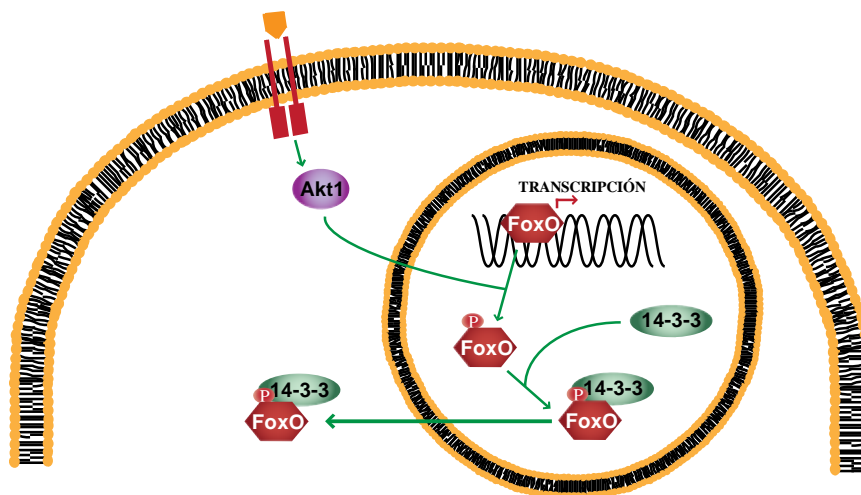


Figura 7. Modelo de inhibición de FoxO. En condiciones pro-apoptóticas FoxO se localiza en el núcleo donde puede transcribir genes pro-apoptóticos. En presencia de factores pro-supervivencia se produce la activación de Akt1, que se transporta al núcleo y fosforila a FoxO. Esta fosforilación genera sitios de unión para las proteínas 14-3-3, cuya asociación a FoxO conduce a su traslocación y retención en el citoplasma, donde no puede llevar a cabo su actividad transcripcional.

E.5 GSK3

GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) es una serina/treonina quinasa inicialmente descrita como una enzima capaz de fosforilar e inhibir a la glucógeno sintasa. Ahora se sabe que participa además en muchas otras vías de señalización y está implicada en múltiples procesos celulares como síntesis proteica, proliferación, apoptosis, diferenciación, dinámica de microtúbulos, motilidad y polarización celular. La desregulación de vías de señalización en las que participa GSK3 ha sido relacionada con el desarrollo de enfermedades como diabetes, Alzheimer, trastornos bipolares o cáncer (Woodgett 2001). Con respecto a la regulación de la muerte celular, GSK3 ha sido descrita como una molécula pro- o anti-apoptótica, dependiendo tanto del tipo celular estudiado como del estímulo empleado para inducir muerte celular (Beurel et al. 2006).

En mamíferos existen dos isoformas de GSK3 codificadas por genes distintos: GSK3 α y GSK3 β . Ambas presentan una alta homología en sus dominios quinasa (98% de identidad), sin embargo, a pesar de ser estructuralmente similares existen diferencias funcionales entre ambas. Esto se evidencia en los *knockout* de GSK3 α y GSK3 β que presentan fenotipos distintos, demostrando que una isoforma no es capaz de compensar la pérdida de función de la otra. El *knockout* de GSK3 α presenta una mayor sensibilidad a insulina (MacAulay et al. 2007). Por el contrario, el *knockout* de GSK3 β es letal en estado embrionario como consecuencia de un aumento en la apoptosis de hepatocitos que causa degeneración hepática (Hoefflich et al. 2000). Este fenotipo es muy similar al descrito para

INTRODUCCIÓN

modelos *knockout* de RelA e IKK β , lo cual implica a GSK3 β en la regulación de la actividad de la vía de NF- κ B.

GSK3 es una quinasa atípica ya que normalmente está activa en las células y presenta una mayor afinidad por sustratos que han sido previamente fosforilados por otras quinastas (“sustratos primados”). A pesar de estar basalmente activa, la actividad de GSK3 puede ser regulada por fosforilación, localización o asociación con otras proteínas.

La fosforilación de una Serina del extremo N-terminal (Ser9 en GSK3 β y Ser21 en GSK3 α) de GSK3 resulta en la inhibición de su actividad. Esta fosforilación puede ser realizada por varias quinastas como Akt1, PKA, PKC o p90rsk, y genera un pseudosustrato que se une al centro activo de la molécula impidiendo su acción sobre otros sustratos fisiológicos (Goode et al. 1992; Cross et al. 1995; Fang et al. 2000; Li et al. 2000). Además de la fosforilación de la propia GSK3 su actividad está regulada también mediante la fosforilación previa de sus sustratos, la cual aumenta la afinidad de GSK3 por el sustrato y, por tanto, aumenta la actividad de GSK3 (Jope et al. 2004).

GSK3 se localiza en el citoplasma, el núcleo y la mitocondria, y su presencia en cada uno de estos compartimentos celulares determinará su accesibilidad a diversos sustratos. Por ejemplo, GSK3 puede fosforilar un gran número de factores de transcripción que se localizan en el núcleo, sin embargo la presencia de GSK3 en el núcleo es muy dinámica, aumentando considerablemente en determinadas fases del ciclo celular o durante el proceso de apoptosis (Meares et al. 2007). Esto permite que sólo en estos momentos esos factores de transcripción sean accesibles para GSK3.

Un último mecanismo de regulación de la actividad de GSK3 bien conocido se produce mediante su interacción con otras proteínas, siendo la vía de Wnt una de las más estudiadas. En condiciones basales GSK3 forma parte de un complejo proteico que favorece la acción de GSK3 sobre β -catenina. La estimulación con Wnt favorece la disrupción de este complejo, reduciendo la actividad de GSK3 sobre β -catenina, lo cual resulta en un aumento en la estabilidad de ésta última (Patel et al. 2004).

OBJETIVOS

En esta tesis doctoral nos planteamos como objetivo general caracterizar los mecanismos moleculares empleados por el receptor de quimioquinas CCR7 para regular la supervivencia de las CD4, enfocándonos en el papel de la quinasa GSK3 y de los factores de transcripción NF- κ B y FoxO. Los objetivos específicos que nos planteamos fueron los siguientes:

- 1) Analizar *in vitro* e *in vivo* el papel que desempeña la quinasa GSK3 en la regulación de la supervivencia de las CD4.
- 2) Determinar si CCR7 regula la actividad de GSK3 y caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de esta quinasa.
- 3) Investigar si CCR7 puede regular la actividad de factores de transcripción de la familia FoxO que han sido descritos como pro-apoptóticos en CD4.
- 4) Estudiar si el papel pro-supervivencia ejercido por CCR7 está mediado por una alteración en el balance entre miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, concretamente analizamos la implicación de Bcl-XL y Bim.
- 5) Analizar la implicación de las moléculas NF- κ B, FoxO y β -catenina como posibles efectores de GSK3 en la regulación de la supervivencia de las CD4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos generales

Las quimioquinas CCL19 y CCL21 y el TNF α se adquirieron de PeproTech (Rocky Hill, NJ). Las quimioquinas humanas se usaron a una concentración de 18 nM y las murinas a 20 nM. La concentración de uso del TNF α es 50 ng/ml. rhIL-4 (IL4 humano recombinante), rhGM-CSF y rmGM-CSF (GM-CSF recombinante murino) se obtuvieron de Immunotools. Las citoquinas humanas se usaron a 1000 U/ml y la murina a 200 U/ml.

El colorante vital CMFDA (5-clorometilfluoresceín diacetato) es de Molecular Probes. DePsipher se adquirió de R&D Systems (Minneapolis, MN). FLIVOTM es un péptido inhibidor de caspasas, Val-Ala-Asp (OMe)-fluorometil cetona (VAD-FMK), conjugado a diferentes fluoróforos que puede ser empleado *in vivo*. Sulforodamina B (SR)-FLIVO (SR, λ_{abs} 565 nm; λ_{em} >600nm) es una forma de FLIVO conjugada a Sulforodamina B que se obtuvo de Immunochemistry Technologies, LLC. El inhibidor general de PKC GF-109203X (concentración de uso; 3,5 μ M) se obtuvo de LC laboratorios. Los inhibidores de GSK3, LiCl (20 mM), Inhibidor-IX (4 μ M) y AR-A014418 (10 μ M), el inhibidor general de PI3K, LY294002 (100 μ M), el inhibidor específico de Akt1/2 (5 μ M), la toxina pertúsica (100 ng/ml), el inhibidor de caspasa 8 (Z-ietd-fmk; 100 μ M), el activador de PKA 8-Br-cAMP (8-Bromoadenosina 3':5'-monofosfato cíclico, 200 μ M), la poli-L-lisina (PLL), el Hoechst 33342, la albúmina de suero bovino (BSA), el LPS (lipopolisacárido; 5 μ g/ml), el cóctel de inhibidores de proteasas y los anticuerpos anti- β actina, anti- α tubulina y anti-láctico deshidrogenasa (LDH) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk (50 μ M) se obtuvo de Biomol (Plymouth Reunión, PA). El yoduro de propidio (PI), los inhibidores específicos de PI3K α (Inhibidor VIII, 250 nM), PI3K β (Inhibidor VI, 1 μ M) y PI3K γ (10 μ M), el inhibidor general de PKCs, Ro-31-8220 (1 μ M), y los inhibidores de ERK1/2 y JNK (UO126 y SP600125) son de Calbiochem (Nottingham, UK) y su concentración de uso es 5 y 50 μ M respectivamente. La anexina V-Fitc, el anticuerpo frente a caspasa-8, y los anticuerpos para analizar la expresión de CCR7 por citometría de flujo (rat anti-human CCR7, mouse anti-rat biotinilado y estreptavidina-PE) son de BD Pharmingen (San Diego, CA).

El anticuerpo anti-Bim se obtuvo de Affinity BioReagents. El anticuerpo anti-Mst1 se adquirió de Epitomics (California, USA) y el anti-p65 de Abcam (Cambridge, UK). Los anticuerpos anti-ERK1, anti-ERK2, anti-I κ B, anti-caspasa 9, anti-Par3, anti-GSK3 α , anti-GSK3 β , anti-G α_{t1} , anti- β -catenina, anti-G α_{12} y anti-G α_{13} son de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti-Bcl_{XL}, anti-Akt1, anti-GS, anti-caspasa 3, anti-FOXO1, anti-FOXO3, anti-fosfo-FOXO1 (fosfo-Ser256), anti-fosfo-FOXO3 (fosfo-Ser253), anti-fosfo-GSK3 α/β (reconoce fosfo-Ser21 en GSK3 α y fosfo-Ser9 en GSK3 β), anti-fosfo-GS (fosfo-Ser641), anti-fosfo-ERK1/2 (reconoce fosfo-Thr202 y fosfo-Tyr204 en ERK1, y fosfo-Thr185 y fosfo-Tyr187 en ERK2), anti-fosfo-ERK5 (fosfo-Thr218/Tyr220) y anti-fosfo-Akt1 (fosfo-Ser473) son de Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En la presente tesis doctoral se han utilizado ratones de la cepa C57BL/6, concretamente machos de 8-10 semanas. Los animales se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas bajo condiciones libres de patógenos y fueron tratados de acuerdo a las especificaciones del Comité para el cuidado y uso de animales de experimentación.

Cultivos celulares

1. CDs humanas derivadas de monocitos

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron a partir de “Buffy coats” obtenidos de donantes sanos (Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid) siguiendo un procedimiento estándar. Las PBMCs se obtienen mediante un gradiente de Lymphoprep (Nycomed, Noruega). A continuación se purifican los monocitos mediante la utilización de anticuerpos anti-CD14 acoplados a “bolitas magnéticas” (Miltenyi Biotech, Alemania), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los monocitos, que se obtienen generalmente con una pureza mayor del 95%, se resuspenden en RPMI 10% FBS (Fetal Bovine Serum) a una concentración de $0,8-1 \times 10^6$ células/ml. Posteriormente se induce su diferenciación hacia CDs añadiendo GM-CSF (1000 U/ml) e IL4 (1000 U/ml) (Sallusto et al. 1994). Las células son cultivadas durante 7 días, añadiéndoles citoquinas cada 2 días, tras lo cual se obtiene una población de CDs inmaduras. La maduración de las CDs se induce mediante la adición de 50 ng/ml de TNF α en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 3 días. El análisis fenotípico de las células muestra que la pureza de células CD80+, CD86+, CD83+ y HLA-DR+ es mayor del 85%. El número de células CD3+, CD14+, CD16+ o CD19+ es menor del 1%.

2. CDs murinas de bazo

Para la obtención de las CDs murinas se extraen los bazos de los ratones y se disgregan en PBS 5mM EDTA, empleando el émbolo de una jeringuilla. A continuación la suspensión celular se pasa a través de filtros de 100 μ m de diámetro (BD, San Diego, CA) y se centrifuga a 1500 rpm. El precipitado celular se resuspende en Buffer de MACS y se purifican las CDs mediante la utilización de un anticuerpo anti-CD11c acoplado a “bolitas magnéticas” (Miltenyi Biotech, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Generalmente se obtiene un enriquecimiento de un 98% de CDs. En algunos casos las células se cultivaron en RPMI completo (10% FBS, 20mM Hepes, 2mM glutamina, 50 U/ml+50 μ g/ml de penicilina+estreptomicina, 50 μ M β -mercaptoetanol) con rmGM-CSF (200 U/ml) a una concentración de 1×10^6 células/ml. La maduración de las CDs se induce añadiendo LPS (5 μ g/ml) durante 24 hs (Aliberti et al. 2000; Ivankovic-Dikic et al. 2000).

3. Cultivo de células Jurkat

Las células Jurkat se mantuvieron en cultivo en RPMI 10% FBS, 20 mM Hepes, 2mM glutamina, 50 U/ml+50µg/ml de penicilina+estreptomicina. Cada tres días aproximadamente se diluyen para mantenerlas a una concentración celular adecuada para su crecimiento. El mantenimiento se realiza en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂.

Western Blot

Las CDs (50-100x10³ células por punto) fueron incubadas durante 30 minutos en RPMI 0,1% BSA para reducir el nivel de actividad basal de las moléculas estudiadas. A continuación fueron estimuladas o no a los tiempos indicados con las quimioquinas correspondientes a una concentración de 18 nM. La estimulación se detuvo solubilizando las células en tampón de carga 2×SDS-PAGE (200 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 mM sodio ortovanadato, 6% SDS, 1 mM EDTA, 4% β-mercaptoetanol, 10% glicerol y azul bromofenol). Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Una vez bloqueadas las membranas, en 5% de leche desnatada en TBST (TBS 0,1% Tween20) pH 7.5, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (0,5 µg/ml) en TBST 5% BSA. Antes y después de incubar las membranas con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:5000 en TBST, 1h, TA, Bio-Rad) se realizaron 3 lavados sucesivos con TBST. Finalmente se revelaron las bandas inmunoreactivas con ECL (Pierce, Rockford, IL).

La densitometría de los *blots* se realizó con el software Multigauge de Fujifilm.

Inmunoprecipitación

En el caso de las células Jurkat se emplearon unos 30x10⁶ células para inmunoprecipitar. Sin embargo, dada la limitación de las muestras en el caso de las CDs se emplearon aproximadamente 8x10⁶ células para cada inmunoprecipitación. Las células se lisaron con un buffer de inmunoprecipitación (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% NP40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT y cóctel de inhibidores de proteasas) (20 min a 4°C) y posteriormente se centrifugaron 10 min a 13000 rpm. A continuación se realizó un “precleaning” de los lisados con proteína A-agarosa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), tras lo cual se centrifugaron y el sobrenadante se inmunoprecipitó con 1 µg del anticuerpo frente a la proteína de interés (GSK3β o FOXO3) durante 18 hs a 4°C. Finalmente añadimos la proteína A-agarosa (1-2 hs a 4°C), realizamos 3 lavados del precipitado con el buffer de inmunoprecipitación, resuspendemos el inmunoprecipitado en buffer 2×SDS-PAGE (200 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 mM sodio ortovanadato, 6% SDS, 1 mM EDTA, 4% β-mercaptoetanol, 10% glicerol y azul bromofenol) y hervimos las muestras durante 5 minutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fraccionamiento nuclear

Para la preparación de extractos nucleares se emplearon $3-4 \times 10^6$ CDs por punto. Las CDs se lisaron en 400 μ l de buffer de extracción de la fracción citosólica (10 mM Hepes pH 7,6, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, espermidina 0,75 mM, espermina 0,75 mM, 10 mM Na_2MoO_4 , 1 mM DTT y cóctel de inhibidores de proteasas) durante 15-20 min a 4°C, y posteriormente se añadieron 25 μ l de NP40 10%. Tras centrifugar recogemos el sobrenadante con las proteínas citosólicas, y sobre el pellet nuclear se añaden 50 μ l de buffer de extracción de proteínas nucleares (20 mM Hepes pH 7,6, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM Na_2MoO_4 , 1 mM DTT y cóctel de inhibidores de proteasas). Incubamos a 4°C durante 20 min y tras centrifugar recogemos el sobrenadante con las proteínas nucleares.

Valoración de proteína

La cuantificación de los extractos proteicos se realizó empleando el kit Dc Protein Assay (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunocitoquímica

Empleamos unas 50×10^3 CDs maduras suspendidas RPMI 0.1% BSA para cada tinción. Estas CDs son incubadas a 37° C sobre cubreobjetos recubiertos con PLL (20 μ g/ml) durante 20-30 min. A continuación se fijan con 4% PFA (paraformaldehído) durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y se lavan 3 veces con PBS. Posteriormente se permeabilizan con 0,2% de Tritón X-100 en PBS (10 min, TA) y se bloquean con 1% BSA en PBS (30 min, TA). Después realizamos la incubación con el anticuerpo primario en PBS 1% BSA (1h, TA). Tras ello las muestras se lavan tres veces con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario en PBS (1h, TA). Se lavan repetidas veces con PBS y agua destilada y finalmente se montan los cristales con el medio de montaje Dako para inmunofluorescencia (Dakocytomation, Carpinteria, CA).

Microscopía de fluorescencia y confocal

Tanto el análisis de las tinciones con Hoechst 33342 y DePsipher para detectar apoptosis como el estudio de la localización nuclear o citoplasmática de GFP (pGFP, p65-GFP y FoxO1-GFP) se realizó empleando un microscopio Axioplan Universal de Zeiss con una cámara CCD Digital Leica DFC 350 FX con un objetivo 63x ó 100x de inmersión en aceite (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Las imágenes de microscopía confocal se tomaron empleando un Microscopio Laser Confocal espectral (CLSM) Leica TCS SP2 equipado con 9 líneas de laser y sistemas AOTF y AOBS. El análisis de las imágenes se llevó a cabo usando el software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe System Inc.).

Citometría de flujo

Las células se analizaron en un citómetro de flujo EPICS (Coulter Electronics) equipado con un láser de Argón sintonizado a 488 nm capaz de procesar 6 señales simultáneas, 2 de dispersión y 4 de fluorescencia en el rango de 525 a 675 nm. La expresión de GFP y la tinción con AnexinaV-Fitc se analizaron en el canal FL1, la tinción con IP con FL3 y para tinciones realizadas con PE (Phycoerythrin) empleamos el canal FL2. El análisis posterior se realizó con el programa CXP Analysis (Beckman Coulter).

Vectores de expresión, siRNAs y nucleofecciones

El vector de expresión de GFP, pEGFP-C1 procede de Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA). El cDNA de la subunidad p65 de NF- κ B subclonado en el vector pEGFP-C1 fue proporcionado por el Dr. Johannes A. Schmid (Universidad de Viena, Centre for Biomolecular Medicine and Pharmacology) (Schmid et al. 2000). La construcción que codifica FoxO1 fusionado a GFP fue proporcionada por el Dr. Ferry G. Unterman (VA Chicago Health Care System, Chicago, USA). PRNK es una construcción que codifica para la región carboxilo-(C)-terminal de Pyk-2 y que actúa como un dominante negativo de esta quinasa. Esta construcción fue cedida por el Dr. Ivan Dikic (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) (Ivankovic-Dikic et al. 2000). La construcción en pcDNA para la $\alpha_{\text{Transducina}}$ (α_T), cedida por la Dra. Pilar de la Peña (Universidad de Oviedo), permite expresar la subunidad α_T de las proteínas G heterotriméricas que secuestra las subunidades $\beta\gamma$ de la célula impidiendo la señalización a partir de este dímero. El plásmido que codifica para una forma de GSK3 β que contiene una mutación del residuo de Serina 9 a Alanina (GSK3 β -S9A) se obtuvo de Addgene. Esta mutación impide que se produzca la fosforilación del residuo de Ser9 que inhibe GSK3 β , de forma que GSK3 β -S9A no es sensible a inhibición por fosforilación, sino que permanece activa en las células que la expresan y, por tanto, lo empleamos como una forma constitutivamente activa de GSK3 β (GSK3 β -CA).

Los RNAs de interferencia (siRNA; small interfering RNA) dirigidos contra GSK3 α , GSK3 β y las subunidades α de las proteínas G heterotriméricas, α_{12} y α_{13} , son siRNAs “*Select*” validados obtenidos de Applied Biosystems.

Las CDs fueron nucleofectadas con 4 μ g de los cDNAs antes indicados o con 0,8 μ g de siRNA. La nucleofección se realizó utilizando el nucleofector y el kit de nucleofección de CDs (AMAXA, Koeln, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de apoptosis

En los experimentos realizados se indujo apoptosis en las CDs mediante la privación de factores de crecimiento. Para ello empleamos el mismo número de CDs viables de partida (determinado mediante exclusión de la tinción con Tripán Blue). Estas CDs son incubadas en RPMI 0,1% BSA 20 mM Hepes durante 24 hs para inducir apoptosis. Como control de supervivencia empleamos el mismo medio suplementado con 10% FCS y 1000 U/ml GM-CSF. Los diversos tratamientos, ya sean con quimioquinas o con inhibidores de GSK3, se añaden a las CDs incubadas en RPMI 0,1% BSA 20 mM Hepes desde el comienzo del experimento. Tras 24 hs en cultivo se analizó la apoptosis con alguno de los siguientes métodos.

1. Tinción con Hoechst 33342

La morfología nuclear varía durante el proceso de apoptosis, produciéndose inicialmente su condensación y finalmente su fraccionamiento. La tinción con Hoechst 33342 permite detectar los cambios morfológicos del núcleo mediante inmunofluorescencia. Las CDs se colocaron sobre cubreobjetos recubiertos con PLL (20 µg/ml) y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente se fijaron con metanol frío durante 5 minutos, se lavaron 2-3 veces con PBS y se incubaron con una solución de Hoechst 33342 (5 µg/ml) en PBS durante 15-20 minutos. Finalmente se lavaron los cristales repetidas veces con PBS y agua destilada y se montaron con medio de montaje Dako (Dakocytomation, Carpinteria, CA).

2. Tinción con Anexina V-Fitc/ IP

Centrifugamos las CDs, las resuspendemos en 100 µl de buffer de anexina (10 mM Hepes (pH 7,4), 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂) y añadimos 5 µl de AnexinaV-Fitc. Incubamos durante 15-20 minutos a TA en oscuridad y a continuación añadimos otros 500 µl de buffer de anexina. Para poder diferenciar las CDs apoptóticas de las necróticas añadimos yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 1 µg/ml, y consideramos sólo las CDs que son Anexina-V+/IP- (Sanchez-Sanchez et al. 2004). El análisis de esta tinción se realiza mediante citometría de flujo.

3. Tinción con DePsipher

Esta tinción permite detectar la variación del potencial de membrana mitocondrial que se produce durante la apoptosis intrínseca. Las CDs se colocaron sobre cubreobjetos recubiertos con PLL (20 µg/ml) y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente se tiñeron empleando un kit para la detección del potencial de membrana mitocondrial siguiendo las instrucciones del proveedor (DePsipher, Invitrogen). Se montaron los cubreobjetos con medio de montaje Dako para inmunofluorescencia (Dakocytomation, Carpinteria, CA) y las muestras se analizaron inmediatamente mediante microscopía de fluorescencia (Sanchez-Sanchez et al. 2004).

Ensayo de apoptosis de CDs *in vivo*

1. Inyección de CDs en ratones C57BL/6, extracción y procesamiento de los ganglios poplíteos

Tras obtener las CDs de bazo como se explicó anteriormente, éstas fueron teñidas con el colorante vital CMFDA (5 μ M) durante 30 minutos a 37°C en PBS 0,1% BSA. La reacción se paró mediante la adición de medio completo y tras una centrifugación se resuspendieron las CDs teñidas con CMFDA (CMFDA-CDs) a una concentración de 2×10^6 CMFDA-CDs/ 25 μ l RPMI. Se realizaron inyecciones subcutáneas en las almohadillas plantares traseras de ratones C57BL/6, inyectándose 2×10^6 CMFDA-CDs en cada pata junto con LPS (1 μ g/ml). Después de 18 horas, que es el tiempo necesario estimado para que las CDs inyectadas hayan llegado a los ganglios poplíteos (Mempel et al. 2004), se inició el tratamiento con el inhibidor de GSK3, LiCl, o con NaCl en los animales de control. El tratamiento consiste en la inyección intraperitoneal de 50 μ moles de LiCl o NaCl en los animales tratados y en los de control, respectivamente. Además de la inyección intraperitoneal, tanto el LiCl como el NaCl fueron añadidos a una concentración de 5 mM en las botellas de agua de los animales. 22 horas después tanto los animales tratados con LiCl como los controles tratados con NaCl fueron inyectados con SR-FLIVO por vía intravenosa. 2 horas después los animales fueron sacrificados y se extrajeron los ganglios poplíteos. Estos ganglios se procesaron para su posterior análisis mediante microscopía multifotón. Para ello se fijaron con PFA 4% (30 min), se lavaron con PBS y se montaron entre dos cubreobjetos de vidrio con medio de montaje para muestras fluorescentes (Prolong Gold, Molecular Probes).

2. Microscopía multifotón y análisis de las CDs apoptóticas en los ganglios linfáticos

Las imágenes se tomaron con un objetivo 20x de inmersión en aceite en un microscopio confocal Leica invertido (TCS-SP2 AOBS spectral system) equipado con un láser de excitación de dos fotones (Ti:Zafiro, Mai Tai, Spectra-Physics). La longitud de onda de excitación óptima para los dos fluorocromos es de 856 nm, y la de detección es de 510-540 nm en el caso del CMFDA y de 560-600 nm para el SR-FLIVO. Los ganglios linfáticos fueron escaneados por ambos lados hasta una profundidad de 200-300 μ m tomando imágenes cada 2 μ m. El posterior análisis de las imágenes se realizó con el software de confocal de Leica (LCS, Leica Confocal Software).

Para analizar la apoptosis *in vivo* cuantificamos la intensidad de la tinción con SR-FLIVO en las CDs marcadas con CMFDA que llegaron a los ganglios poplíteos. Empleamos la herramienta de cuantificación del LCS, que permite trazar regiones de interés lineales y proporciona las gráficas con el perfil de intensidad tanto del CMFDA como del SR-FLIVO a lo largo de la región de interés. Por tanto utilizamos esta herramienta para trazar una región de interés en cada célula marcada con CMFDA y obtenemos los valores de máxima amplitud tanto de SR-FLIVO como de CMFDA. Como medida de la incorporación de SR-FLIVO y, por tanto, de la apoptosis de las CDs *in vivo*, empleamos el valor obtenido al dividir la máxima amplitud de SR-FLIVO entre la máxima amplitud de CMFDA para cada célula, de este modo evitamos posibles falsos resultados como consecuencia de un cruce de canales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis estadístico

Los datos son representados como la media \pm SEM (standard error of the mean). El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el test de la t de Student “no pareado”, considerando como significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

A. GSK3 es una molécula pro-apoptótica en CDs

A.1 GSK3 es una molécula pro-apoptótica en CDs humanas *in vitro*

Las CDs tienen una función importante en el sistema inmune como CPAs capaces de activar a los linfocitos T. Para ello las CDs activadas migran a los ganglios linfáticos donde finalmente sufren un proceso de apoptosis. La longevidad de las CDs tiene efecto sobre la respuesta inmunológica, ya que una menor supervivencia de las CDs disminuye la activación de la respuesta inmune adaptativa (Jung et al. 2002; Hou et al. 2004) y, por el contrario, un aumento en su longevidad se ha relacionado con el desarrollo de autoinmunidad (Chen et al. 2006; Chen et al. 2007b). Sin embargo, los mecanismos que regulan la supervivencia de las CDs son en gran medida desconocidos. GSK3 es una molécula que ha sido implicada en apoptosis con una función pro- o anti-apoptótica dependiendo tanto del tipo celular como del estímulo inductor de apoptosis (Beurel et al. 2006). En vista de esta información nos propusimos analizar el papel ejercido por GSK3 en la supervivencia de las CDs, empleando la privación de factores de crecimiento como sistema inductor de apoptosis. Para ello las CDs se mantuvieron 24 horas en RPMI 0,1% BSA, para inducir apoptosis, o en RPMI 10% FCS, medio que mantiene la supervivencia celular.

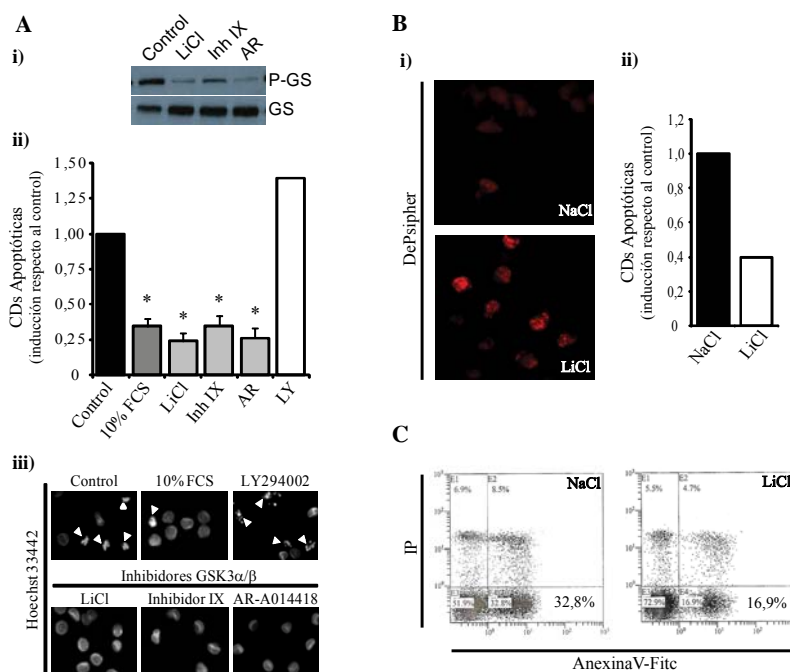


Figura 8. La inhibición de GSK3 reduce la apoptosis de las CDs. **A)** Las CDs se mantuvieron en RPMI 0,1%BSA durante 1 hora con tres inhibidores diferentes de GSK3, LiCl (20 mM), Inhibidor IX (4 μ M) o AR-A014418 (10 μ M), o bien sin tratamiento, como control. A continuación se lisaron y analizamos mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de la glucógeno sintasa (GS) (i). Realizamos ensayos de apoptosis de CDs en presencia de los inhibidores de GSK3 manteniendo las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 24 horas. Empleamos CDs mantenidas en RPMI 10% FCS como control de supervivencia o con LY294002 (100 μ M) como control positivo de inducción de apoptosis. El porcentaje de CDs apoptóticas se analizó mediante tinción con Hoechst 33342 (iii) para determinar la morfología nuclear. La gráfica (ii) representa el porcentaje de CDs apoptóticas obtenido con los distintos tratamientos referido al obtenido en CDs sin tratar. (La gráfica muestra la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * p <0,05). **B y C)** Realizamos ensayos de apoptosis en los cuales las CDs fueron tratadas con LiCl o con NaCl (ambos a 20 mM) como control. **B)** El porcentaje de CDs apoptóticas se determinó mediante tinción con DePsipher (*ver Materiales y Métodos*). Se muestra una imagen representativa de la tinción (i) y la gráfica con el porcentaje de apoptosis de CDs tratadas con LiCl referido al obtenido en las tratadas con NaCl (ii). En **C)** el porcentaje de apoptosis de las CDs se determinó tiñendo las CDs con IP y AnexinaV-Fitc, y analizando la apoptosis mediante citometría de flujo.

Para determinar si GSK3 ejerce un papel pro- o anti-apoptótico en las CDs realizamos ensayos de apoptosis en presencia de diferentes inhibidores específicos de GSK3, incluyendo LiCl, inhibidor IX y AR-A014418. Como se muestra en la [Figura 8A](#), el tratamiento con los tres inhibidores reduce la fosforilación de la glucógeno sintasa, uno de los sustratos mejor caracterizados de GSK3, lo cual demuestra que la actividad de GSK3 está siendo inhibida. En condiciones que inducen apoptosis la inhibición de GSK3 tiene como consecuencia una reducción en la apoptosis de las CDs ([Figura 8](#)), lo cual ha sido observado empleando diversos métodos como son la tinción con Hoechst 33342 ([Figura 8A](#)), con DePsipher ([Figura 8B](#)) o con AnexinaV-Fitc/Ioduro de propidio ([Figura 8C](#)) (*ver Materiales y Métodos*). Para mostrar que este aumento en la supervivencia no es un efecto general producido por el tratamiento con cualquier inhibidor empleamos también LY294002, un inhibidor de la vía de PI3K/Akt cuyo efecto como inductor de la apoptosis en CDs ha sido descrito anteriormente (Sanchez-Sanchez et al. 2004) ([Figura 8A](#)). Cabe destacar que el efecto protector frente a la apoptosis que ejercen los inhibidores de GSK3 es similar al ejercido por la presencia de suero ([Figura 8A](#)), lo cual indica un marcado efecto pro-apoptótico de GSK3 en las CDs.

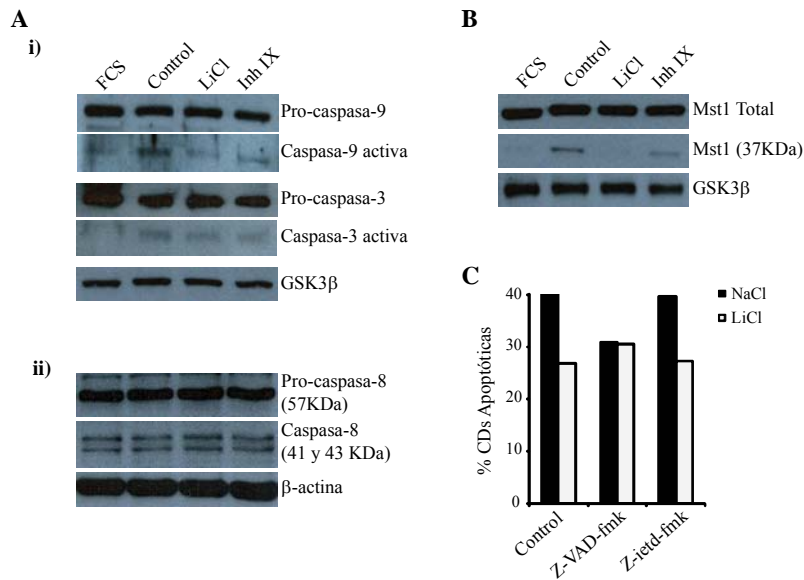


Figura 9. La inhibición de GSK3 reduce la activación de las caspasas implicadas en la apoptosis de CDs. A) Las CDs se mantuvieron 24 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia o ausencia de dos inhibidores de GSK3, LiCl (20 mM) e Inhibidor IX (4 μM). Empleamos CDs mantenidas en RPMI 10% FCS como control de supervivencia y CDs mantenidas simplemente en RPMI 0,1% BSA para inducir apoptosis (Control). Tras 24 horas lisamos las CDs y analizamos por *Western Blot* la activación de diversas caspasas empleando Abs frente a caspasa-9, caspasa-3 (**i**) y caspasa-8 (**ii**). **B)** También analizamos la actividad de caspasa-3 empleando un Ab frente a Mst1, que es un sustrato de caspasa-3. **C)** Realizamos ensayos de apoptosis de CDs tratadas con NaCl o LiCl (ambos a 20 mM) en presencia de un inhibidor general de caspasas (Z-VAD-fmk, 50 μM), de un inhibidor específico de caspasa-8 (Z-ietd-fmk, 100 μM) o de DMSO como control (Control). La apoptosis se analizó mediante tinción con IP y AnexinaV-Fitc, y la gráfica muestra el porcentaje de CDs apoptóticas obtenido (*ver materiales y métodos*). (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

La privación de factores de crecimiento es un estímulo que induce apoptosis por vía mitocondrial ([Figura 1](#)) y, como consecuencia, resulta en la activación de caspasa-9 como caspasa iniciadora y de caspasa-3 como efectora. Sin embargo, no se produce la activación de caspasa-8, que es la caspasa iniciadora de la vía extrínseca (Li et al. 2008). Por tanto, nos planteamos si el efecto anti-apoptótico resultante de la inhibición de GSK3 estaría mediado por una menor activación de caspasa-9 y caspasa-3. Como se muestra en la [Figura 9A](#), la inhibición de GSK3 tiene como consecuencia una menor activación de caspasa-9 y -3, pero no ejerce un gran efecto sobre caspasa-8. Además analizamos el efecto de los inhibidores de GSK3 sobre la proteólisis de la quinasa Mst1

RESULTADOS

como indicador de la actividad de caspasa-3. Se ha sido descrito que la proteólisis de Mst1 producida por caspasa-3 origina un fragmento de Mst1 de 37 KDa implicado en apoptosis (Graves et al. 1998). En línea con lo observado anteriormente los niveles de la forma proteolizada de Mst1 son menores en CDs tratadas con los inhibidores de GSK3 (Figura 9B). Para confirmar que el efecto pro-supervivencia de los inhibidores de GSK3 está mediado por una menor actividad de caspasas implicadas en la apoptosis por vía intrínseca realizamos ensayos de apoptosis en presencia de un inhibidor específico de caspasa-8, Z-ietd-fmk, y de un inhibidor general de caspasas, Z-VAD-fmk, en CDs tratadas con LiCl o con NaCl. En presencia del inhibidor general de caspasas el efecto del LiCl sobre la apoptosis se eliminó prácticamente por completo (Figura 9C). Sin embargo, el inhibidor de caspasa-8 no tuvo ningún efecto sobre la apoptosis. Estos experimentos sugieren que el aumento de la supervivencia observado al inhibir GSK3 es debido a que la actividad de esta quinasa está favoreciendo la activación de las caspasas-9 y -3.

En la Figura 10 se muestra que en presencia de suero, que contiene factores pro-supervivencia, Akt1, una molécula clave para la supervivencia de las CDs (Sanchez-Sanchez et al. 2004), se encuentra activada (Figura 10B). Sin embargo, no existen variaciones en la activación de moléculas implicadas en la migración, como es el caso de ERK1/2 (Riol-Blanco et al. 2005). Observamos que en estas condiciones GSK3 se encuentra fosforilada en un residuo inhibitorio, Ser21 en GSK3 α y Ser9 en GSK3 β , lo cual es consistente con los resultados descritos anteriormente que indican que GSK3 es una molécula pro-apoptótica en CDs. De hecho el carácter pro-apoptótico de GSK3 se ve reforzado por el hecho de que incluso en presencia de suero una mayor inhibición de GSK3 mediante el uso de inhibidores específicos resulta en un aumento en la supervivencia de las CDs (Figura 10C).

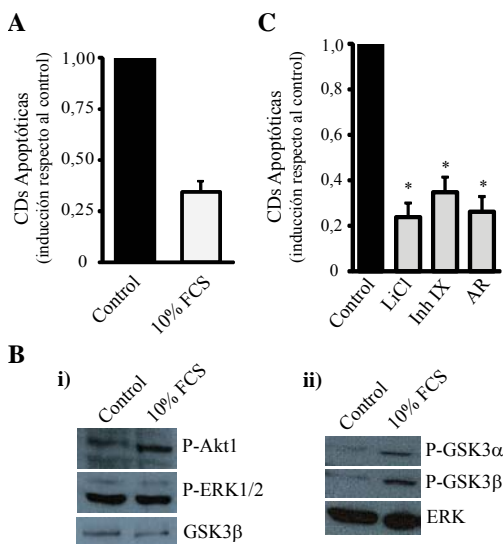


Figura 10. En presencia de FCS GSK3 resulta inhibida, y una mayor inhibición empleando inhibidores conduce a un aumento de la supervivencia de CDs incluso en condiciones no apoptóticas. **A y B)** Realizamos ensayos de apoptosis manteniendo las CDs en RPMI 0,1% BSA 24 horas para inducir apoptosis (Control) o bien en presencia de 10% FCS como control de supervivencia. **A)** Posteriormente empleamos parte de las CDs para analizar el porcentaje de apoptosis mediante tinción con Hoechst 33342 y **B)** lisamos el resto para analizar por *Western Blot* el estado de activación de diversas moléculas empleando Abs contra formas fosforiladas de Akt1, ERK1/2 (i) y GSK3 α/β (ii). **C)** Analizamos mediante tinción con Hoechst 33342 el porcentaje de apoptosis en CDs mantenidas 24 horas en RPMI 10% FCS, ya sea en presencia de tres inhibidores diferentes de GSK3, LiCl (20 mM), Inhibidor IX (4 μ M) o AR-A014418 (10 μ M), o bien sin ningún tratamiento adicional (Control). (Las gráficas muestran la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

A.2 GSK3 β es la principal isoforma reguladora de la supervivencia en CDs

A continuación analizamos si existe alguna diferencia funcional entre GSK3 α y GSK3 β en relación con la regulación de la apoptosis de las CDs. Dado que en presencia de suero ambas se encuentran inhibidas y que los inhibidores de GSK3 bloquean ambas isoformas, empleamos siRNAs específicos para cada isoforma y realizamos ensayos de

apoptosis para evaluar el efecto de ambas sobre la supervivencia de las CDs. Observamos que la disminución de GSK3 α tiene muy poco efecto sobre la apoptosis (Figura 11A). Sin embargo, la reducción de GSK3 β reduce la apoptosis de las CDs aproximadamente en un 40% (Figura 11B). En experimentos en los cuales la reducción de ambas isoformas fue similar, aproximadamente un 60%, la disminución de GSK3 α redujo la apoptosis aproximadamente un 15% mientras que GSK3 β lo hizo un 50%. Por tanto, GSK3 β parece ser la principal isoforma implicada en regular la supervivencia de las CDs.

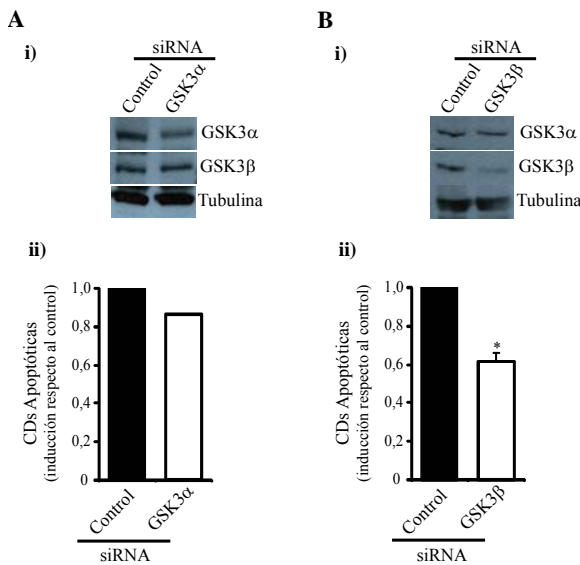


Figura 11. GSK3 β es la principal isoforma de GSK3 implicada en la regulación de la supervivencia en CDs. **A)** Las CDs se nucleofectaron con un siRNA específico para GSK3 α o con un siRNA control y se recogieron 36-48 horas después de la transfección. Parte de las células se lisaron para comprobar mediante *Western Blot* si se redujo la expresión de GSK3 α (i) pero no de GSK3 β , y empleamos un Ab contra α -Tubulina como control de carga. El resto de las células se mantuvieron durante 24 horas en RPMI 0,1% BSA, tras lo cual analizamos el porcentaje de apoptosis mediante tinción con Hoechst 33342 (ii). (La gráfica muestra un experimento representativo de 2 realizados). **B)** Las CDs fueron nucleofectadas con un siRNA específico para GSK3 β o con un siRNA control y se recogieron 36-48 horas después de la transfección. Parte de las células se lisaron para comprobar por *Western Blot* si se redujo la expresión de GSK3 β (i) pero no de GSK3 α , empleando α -Tubulina como control de carga. El resto de las células se mantuvieron durante 24 horas en RPMI 0,1% BSA, tras lo cual analizamos el porcentaje de apoptosis mediante tinción con Hoechst 33342 (ii). (La gráfica muestra la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * p <0,05).

Para confirmar el efecto de GSK3 β sobre la supervivencia empleamos una construcción de GSK3 β que tiene mutado el residuo de serina 9 a alanina, de modo que este residuo no puede ser fosforilado y, por tanto, inhibido. Esto permite que esta proteína no responda a estímulos inhibidores, permaneciendo constitutivamente activa en las células que la expresan. La expresión de esta forma constitutivamente activa en las CDs produce un aumento en la apoptosis (Figura 12), apoyando los resultados previos que apuntan a un papel pro-apoptótico de GSK3 β en estas células.

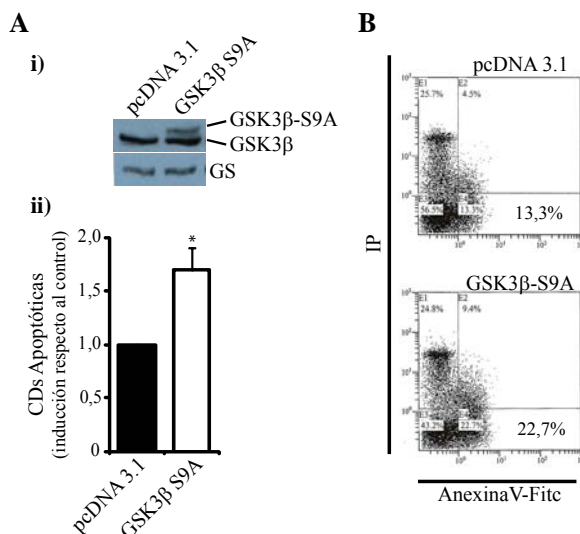


Figura 12. La actividad de GSK3 β aumenta la apoptosis de las CDs. **A)** Las CDs se nucleofectaron con el vector GSK3 β -CA o con pcDNA como control y se recogieron 14 horas después de la transfección. Empleamos parte de las células para comprobar mediante *Western Blot* si se expresó el vector GSK3 β -CA (i), empleando un Ab contra GSK3 β dado que la forma expresada está fusionada a HA y por tanto sufre un ligero cambio en la movilidad electroforética, y utilizamos un Ab frente a GS como control de carga. El resto de las células se mantuvieron durante 24 horas en RPMI 0,1% BSA, tras lo cual analizamos el porcentaje de apoptosis mediante tinción con Hoechst 33342 (ii) o **B)** con IP y AnexinaV-Fitc. (La gráfica muestra la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * p <0,05).

RESULTADOS

A.3 GSK3 es pro-apoptótica en CDs murinas tanto *in vitro* como *in vivo*

Cuando se trabaja con células en cultivo estudiando un determinado proceso *in vitro*, es importante analizar si los resultados obtenidos tienen relevancia en condiciones fisiológicas, es decir, en un sistema *in vivo*. Puesto que GSK3 es una molécula pro-apoptótica en CDs humanas *in vitro*, como demuestran los resultados mostrados anteriormente, y dado que este efecto parece ser tan importante que su inhibición aumenta la supervivencia incluso en células que no están expuestas a ningún estímulo apoptótico (Figura 10C), nos planteamos si este efecto es relevante también *in vivo*, donde pueden existir muchos otros factores que afecten a la supervivencia de las CDs. Por tanto nos propusimos estudiar el efecto de la inhibición de GSK3 sobre la supervivencia de las CDs en los ganglios linfáticos *in vivo*. En primer lugar realizamos ensayos de supervivencia en CDs murinas en presencia de inhibidores de GSK3 para comprobar que esta quinasa es pro-apoptótica también en CDs murinas. Observamos que la inhibición de GSK3 también reduce la apoptosis de las CDs murinas (Figura 13), lo cual nos permite emplear el modelo murino para estudiar el efecto de GSK3 sobre la apoptosis de CDs *in vivo*.

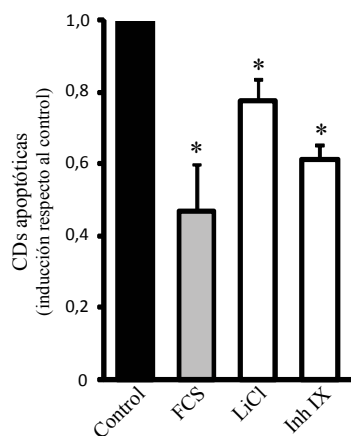


Figura 13. La inhibición de GSK3 reduce la apoptosis de CDs murinas. Preparamos CDs esplénicas de ratones C57BL/6 (ver *Materiales y Métodos*) y las mantuvimos 24 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia de dos inhibidores diferentes de GSK3, LiCl (20 mM) e Inhibidor IX (4 μ M). Empleamos CDs que fueron mantenidas en RPMI 10% FCS, como control de supervivencia, o bien sin ningún tratamiento, como control positivo de apoptosis (Control). El porcentaje de apoptosis se analizó mediante tinción con Hoechst 33342 y la gráfica representa el porcentaje de CDs apoptóticas obtenido con los distintos tratamientos referido al obtenido en CDs sin tratar. (La gráfica muestra la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

Las CDs ejercen su función como CPAs en los ganglios linfáticos y es en estos órganos donde sufren apoptosis (Kamath et al. 2000; Garg et al. 2003) y, por tanto, donde más relevante puede ser la alteración de la supervivencia de las CDs sobre la respuesta inmunológica. Por esta razón decidimos analizar si GSK3 es pro-apoptótica en los ganglios linfáticos *in vivo*. Para ello obtuvimos CDs esplénicas de ratones C57BL/6 que fueron teñidas con el colorante intravital CMFDA (*5-Clorometilfluoresceín Diacetato*). Estas CDs se inocularon en las almohadillas plantares traseras de ratones aceptores. Las CDs inoculadas por esta vía drenan en los ganglios poplíteos. 18 horas después de la inyección, que es el tiempo que se estima necesario para que las CDs inyectadas hayan llegado a los ganglios poplíteos (Mempel et al. 2004), iniciamos el tratamiento con LiCl para inhibir GSK3 *in vivo*, o con NaCl en los animales de control. Estas sales fueron inyectadas por vía intraperitoneal y, además, se añadieron en la bebida de los animales tratados. El tratamiento se mantuvo durante un período de 22 horas, tiempo necesario para que las CDs inoculadas y presentes en los ganglios linfáticos entren en apoptosis (Riol-Blanco et al. 2009). Para detectar el nivel de apoptosis *in vivo* inyectamos SR-FLIVO por vía intravenosa a las 22 horas de comenzar el tratamiento con LiCl o NaCl y 2 horas después los animales fueron sacrificados (Figura 14A), se extrajeron los ganglios poplíteos y se analizó, en las CDs marcadas con CMFDA que fueron inoculadas, el grado de apoptosis empleando la tinción con SR-FLIVO como indicador de la activación de caspasas. FLIVO [(*Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (VAD-FMK)*]

RESULTADOS

es un inhibidor general de caspasas que se une de forma irreversible únicamente a caspasas activas. Este compuesto está conjugado a un colorante fluorescente, en este caso empleamos SR-FLIVO (FLIVO conjugado a sulforodamina). SR-FLIVO puede ser empleado *in vivo* (Pozarowski et al. 2003) inyectado por vía intravenosa. Las células son permeables a este compuesto, de tal manera que cuando penetra en células no apoptóticas difunde de nuevo al exterior. Sin embargo, si penetra en células apoptóticas en las cuales se han activado las caspasas FLIVO se unirá a estas caspasas activas quedando retenido en el interior celular. Esto implica que las células apoptóticas estarán marcadas con SR-FLIVO, lo que nos permitirá diferenciarlas de células no apoptóticas que no estarán teñidas (Figura 14B).

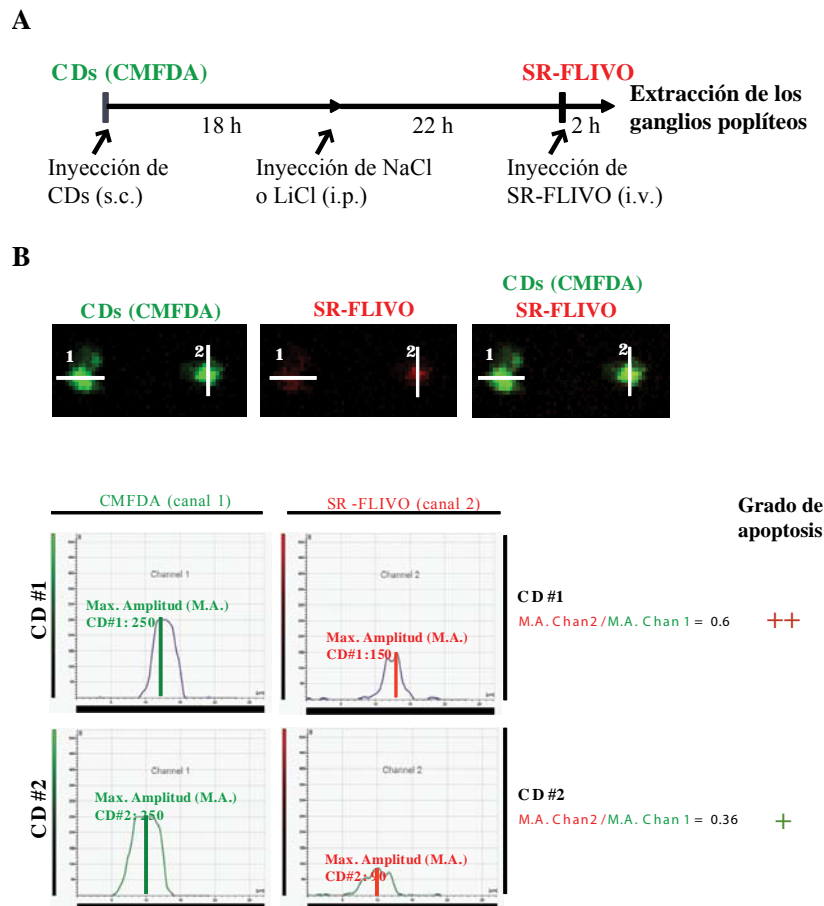


Figura 14. Procedimiento realizado para analizar la función de GSK3 en la apoptosis de CDs *in vivo*. **A)** Esquema del procedimiento seguido para analizar el papel de GSK3 en la supervivencia de CDs murinas *in vivo* en los ganglios linfáticos. Inyectamos 2×10^6 CDs teñidas con CMFDA por vía subcutánea (s.c.) en las almohadillas plantares traseras de ratones aceptores. 18 horas después inyectamos intraperitonealmente (i.p.) 50 μ moles de LiCl, para inhibir GSK3 *in vivo*, o de NaCl, como control. Después de 22 horas inyectamos SR-FLIVO por vía intravenosa (i.v.) para teñir las CDs apoptóticas, y tras 2 horas los animales fueron sacrificados y se extrajeron los ganglios poplíteos para analizar la apoptosis de las CDs-CMFDA *in vivo* mediante microscopía multifotón. **B)** Procedimiento de análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En la parte superior se muestran imágenes representativas de una sección de los ganglios poplíteos obtenidas mediante microscopía multifotón, tanto del canal-1 que representa las CDs teñidas con CMFDA como del canal-2 que representa la tinción con SR-FLIVO, y la superposición de ambas. También se muestran dos regiones de interés (ROI) lineales realizadas con el software confocal de Leica (LCS) empleado para analizar la apoptosis de las CDs *in vivo*. En la parte inferior se muestran las gráficas obtenidas con la herramienta de cuantificación del LCS que representan la intensidad de la tinción tanto de CMFDA como de SR-FLIVO para las ROI seleccionadas en la imagen superior. Como puede observarse la intensidad de la tinción de SR-FLIVO varía entre ambas células. El parámetro que empleamos como indicador del grado de apoptosis de las CDs teñidas con CMFDA es la relación entre la máxima intensidad de SR-FLIVO y la de CMFDA para cada célula. (Ver *Materiales y Métodos* y sección A.3 de Resultados).

RESULTADOS

El análisis de los ganglios se realizó mediante microscopía multifotón. Para determinar el grado de apoptosis de las CDs, las imágenes obtenidas con el multifotón fueron analizadas con el software de confocal de Leica (*ver Materiales y Métodos*). El parámetro que tomamos como indicador del grado de apoptosis de cada CD es la relación entre la intensidad de SR-FLIVO y la de CMFDA para esa célula, de tal modo que cuanto mayor sea este valor mayor será también el grado de apoptosis porque la célula tendrá mayor actividad de caspasas. Si GSK3 es una molécula pro-apoptótica también *in vivo*, las CDs marcadas con CMFDA que se inocularon deberían presentar una tinción menor con SR-FLIVO en los animales tratados con LiCl, que en los controles, que fueron tratados con NaCl. Como se observa en la [Figura 15](#) los resultados obtenidos en dos experimentos independientes muestran que en las CDs de animales tratados con NaCl el grado de apoptosis es mayor que en los tratados con LiCl, siendo la media de 0,33 y 0,35 en los controles frente al 0,25 y 0,28 obtenido en presencia de LiCl. Esto supone una reducción en el grado de apoptosis de un 22-23%, lo cual coincide con la inhibición obtenida *in vitro* en CDs murinas tratadas con LiCl ([Figura 13](#)).

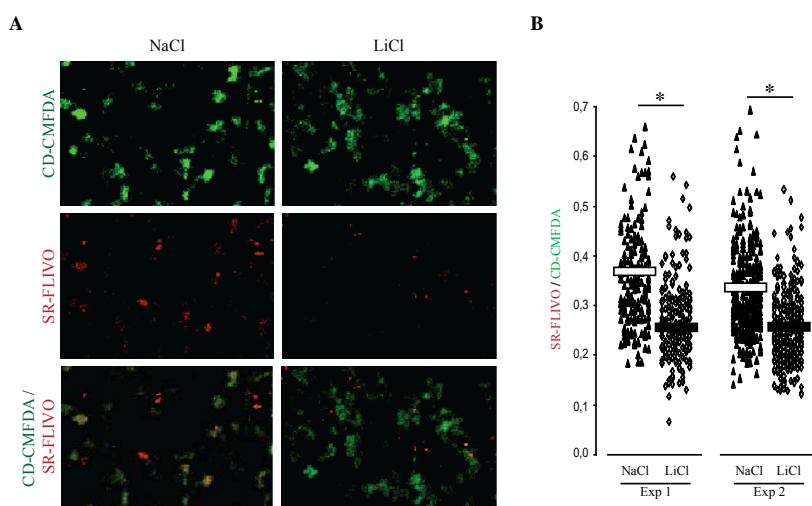


Figura 15. GSK3 es una molécula pro-apoptótica *in vivo* en CDs. A) Imágenes representativas de los ganglios poplíteos de ratones que fueron tratados con LiCl o con NaCl obtenidas mediante microscopía multifotón. Se muestra la tinción de CMFDA, de SR-FLIVO, y la superposición de ambas. B) Gráfica que representa el valor de apoptosis (relación entre el valor de máxima intensidad de SR-FLIVO y CMFDA) obtenido para las CDs de ratones tratados con LiCl o NaCl en dos experimentos independientes. * $p < 0,5 \times 10^{-5}$.

B. CCR7 regula negativamente moléculas pro-apoptóticas como GSK3 β y FOXO

B.1 CCR7 inhibe la actividad de GSK3 β sin afectar a su localización

CCR7 es un receptor de quimioquinas cuya activación por sus ligandos, CCL19 y CCL21, no sólo regula la quimiotaxis de las CDs sino también otras funciones como la supervivencia celular (Sanchez-Sanchez et al. 2004). El estudio de los mecanismos moleculares empleados por este receptor para regular la supervivencia mostró que es necesario que se produzca la activación de una vía en la que están implicadas PI3K, Akt1 y factores de transcripción de la familia NF- κ B. Sin embargo, se desconoce si están implicadas otras vías de señalización. Dado el papel pro-supervivencia que tiene CCR7 en CDs nos propusimos estudiar que efecto tiene la estimulación de este receptor sobre dos moléculas pro-apoptóticas como son GSK3 β y FoxO (Riol-Blanco et al. 2009).

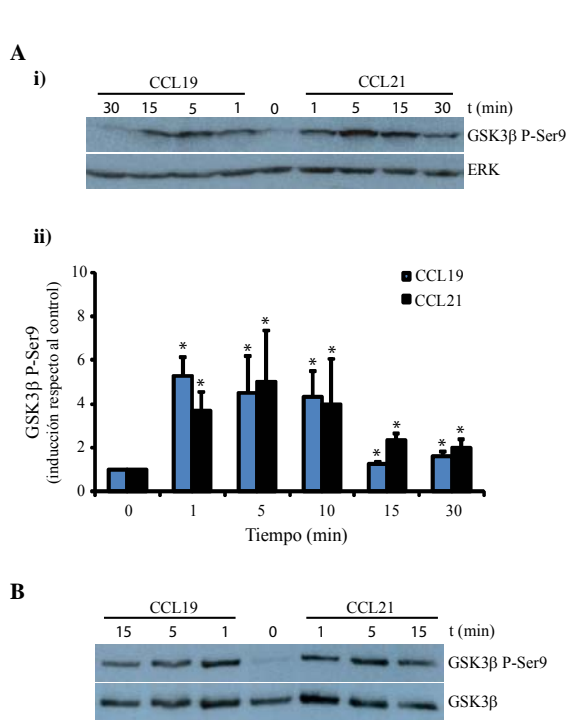


Figura 16. La activación de CCR7 induce fosforilación de GSK3β en el residuo de Ser9 tanto en CD humanas como murinas. **A)** Mantuvimos CD maduras humanas derivadas de monocitos en RPMI 0,1% BSA durante 30 minutos, posteriormente las estimulamos con CCL19 o CCL21 (20 nM) y a los tiempos indicados las lisamos para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de GSK3β empleando un Ab contra la forma fosforilada en Serina9 de GSK3β **(i)** y ERK2 como control de carga. **(ii)** Gráfica que representa el aumento en la fosforilación de GSK3β inducido por CCL19 y CCL21 a distintos tiempos referido al nivel de fosforilación basal (en ausencia de estímulo). Los valores se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos de estimulación con CCL19 y CCL21. (La gráfica muestra la media ± SEM de 3 experimentos realizados, *p<0,05). **B)** Preparamos CD esplénicas de ratones C57BL/6 y las maduramos con LPS (*ver Materiales y Métodos*). Las CD se mantuvieron 30 minutos en RPMI 0,1%BSA. A continuación se estimularon con CCL19 o CCL21 (18 nM) y, a los tiempos indicados, se lisaron para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de GSK3β empleando un Ab contra la forma fosforilada en Serina9 de GSK3β y un Ab contra GSK3β total como control de carga.

En primer lugar analizamos si la estimulación de las CD con los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21, tiene algún efecto sobre el estado de fosforilación de GSK3β. Puesto que GSK3β es pro-apoptótica y CCR7 promueve la supervivencia, cabe esperar que la activación de este receptor produzca una inhibición de GSK3β. De hecho la estimulación tanto con CCL19 como con CCL21 produce un aumento de la fosforilación de GSK3 β en Ser9 que, como se mencionó anteriormente, es un residuo cuya fosforilación conduce a la inhibición de la actividad de GSK3 β (Figura 16A). Esta inhibición es muy rápida, ya que un minuto después de realizar la estimulación la fosforilación ya ha aumentado entre 4 y 6 veces, y alrededor de los 30 minutos prácticamente se han recuperado los niveles basales de actividad de GSK3β. Esta inhibición se produce tanto en CD humanas derivadas de monocitos (Figura 16A) como en CD murinas (Figura 16B).

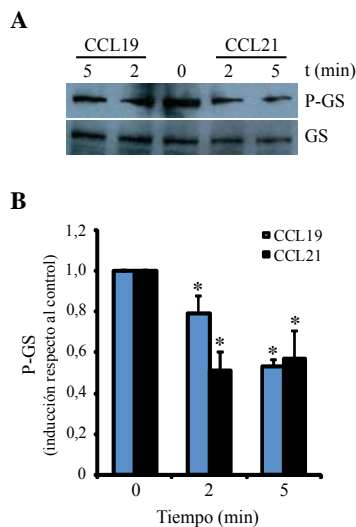


Figura 17. GSK3β es inhibida en CD estimuladas con CCL19 o CCL21. **A)** Mantuvimos CD maduras humanas en RPMI 0,1% BSA durante 30 minutos. Posteriormente las estimulamos con CCL19 o CCL21 (20 nM) y a los tiempos indicados las lisamos para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de GS empleando un Ab contra la forma fosforilada en Serina641 de GS y un Ab frente a GS total como control de carga. **B)** Gráfica que representa la variación en la fosforilación de GS inducida por CCL19 y CCL21 a 2 y 5 minutos, referido al nivel de fosforilación basal (en ausencia de estímulo). Los valores se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos de estimulación con CCL19 y CCL21. (La gráfica muestra la media ± SEM de 3 experimentos realizados, *p<0,05).

RESULTADOS

Quisimos también comprobar que la fosforilación inhibitoria de GSK3 β inducida por CCR7 bloqueaba realmente la actividad de GSK3. Para ello estimulamos CDs con CCL19 y CCL21 y analizamos el efecto de la activación de CCR7 sobre la fosforilación de la glucógeno sintasa (GS), un sustrato de GSK3. La estimulación tanto con CCL19 como con CCL21 da lugar a una rápida reducción en la fosforilación de GS (Figura 17), como cabe esperar si se está inhibiendo la actividad de GSK3.

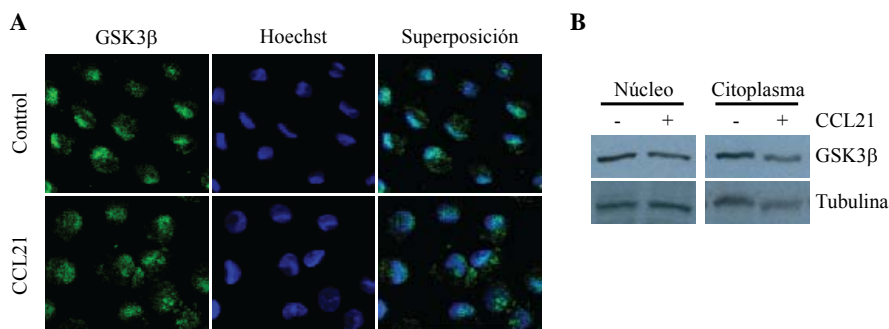


Figura 18. La estimulación con CCL21 no altera la localización de GSK3 β en CDs. **A)** Mantuvimos CDs maduras humanas en RPMI 0,1% BSA durante 30 minutos a 37°C, sobre cubreobjetos que habían sido previamente recubiertos con PLL, tras lo cual se estimularon o no (Control) con CCL21 (20 nM) durante 5 min. Las muestras se tiñeron para inmunofluorescencia con un Ab contra GSK3 β total (ver *Materiales y Métodos*) y con Hoechst 33342 para localizar el núcleo de la célula. Se muestran imágenes representativas de la tinción de GSK3 β y Hoechst, así como la superposición de ambas, en CDs estimuladas o no con CCL21. **B)** Las CDs se mantuvieron durante 5-6 horas en RPMI 0,1 % BSA en presencia o ausencia de CCL21 (20nM). Pasado este tiempo seguimos el protocolo de fraccionamiento nuclear (ver materiales y métodos) y analizamos mediante *Western Blot* la localización de GSK3 β en la fracción nuclear y citoplasmática en CDs tratadas o no con CCL21. Para ello empleamos un Ab contra GSK3 β total y contra α -Tubulina como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

Existen otros mecanismos que permiten regular la actividad de GSK3 además de la fosforilación. Uno de los más importantes consiste en regular la localización intracelular de esta molécula, lo cual determina la accesibilidad de GSK3 a diferentes sustratos. Por ejemplo, GSK3 β es capaz de regular la actividad de varios factores de transcripción, pero para llevar a cabo esta función debe estar localizada en el núcleo que es donde se encuentran estos factores (Meares et al. 2007). Por tanto, nos planteamos estudiar si la estimulación con CCL19 o CCL21 puede alterar la localización nuclear de GSK3 β además de su fosforilación. Realizamos inmunofluorescencias para determinar la localización de GSK3 β en CDs estimuladas o no con las quimioquinas. Observamos que la localización de GSK3 β es predominantemente nuclear en CDs no estimuladas, aunque también localiza en el citosol, y que la estimulación con las quimioquinas no produce ningún cambio considerable en la localización de esta molécula (Figura 18A). Confirmamos que la estimulación con los ligandos de CCR7 no produce ningún cambio en la localización de GSK3 β realizando experimentos de fraccionamiento subcelular que permiten separar la fracción proteica nuclear de la citoplasmática (Figura 18B).

B.2 CCR7 inhibe la actividad de FOXO1/3 regulando su estado de fosforilación y su localización

FoxO es un factor de transcripción que ha sido descrito como una molécula pro-apoptótica en CDs cuya actividad se regula mediante localización (Riol-Blanco et al. 2009). La presencia de factores pro-supervivencia que activan Akt1 puede inducir la traslocación de FoxO al citoplasma, donde obviamente no puede regular la transcripción y, por tanto, no es activo. La fosforilación de FoxO mediada por Akt genera sitios de unión para las proteínas 14-3-3, y la interacción con estas proteínas puede retener a

FoxO en el citoplasma (Brunet et al. 1999; Brunet et al. 2002). Dado que la estimulación con CCL19 y CCL21 activa Akt1 y ejerce un papel pro-supervivencia, decidimos analizar si la inhibición de la actividad de FoxO es uno de los mecanismos empleados por CCR7 para extender la supervivencia de las CDs. Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar estimulamos las CDs con CCL19 y CCL21 para analizar su efecto sobre el estado de fosforilación tanto de FoxO1 como de FoxO3 en residuos fosforilados por Akt1. Observamos que ambas quimioquinas producen un aumento en la fosforilación de estos residuos de forma rápida (a los 2 minutos ya se encuentran fosforilados) y a los 30 minutos el nivel de fosforilación continúa elevado (Figura 19). Estos resultados son diferentes a los obtenidos con respecto a la fosforilación de GSK3β que era transitoria, y a los 30 minutos ya se veía considerablemente reducida (Figura 19A).

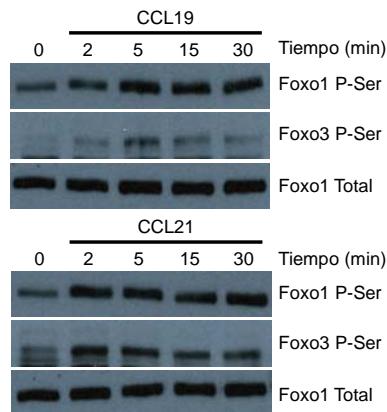


Figura 19. La estimulación de CDs con CCL19 o CCL21 induce fosforilación de FoxO1 y FoxO3 (en Ser256 y Ser253, respectivamente). Mantuvimos CDs maduras humanas derivadas de monocitos en RPMI 0,1% BSA durante 3 horas, posteriormente las estimulamos con CCL19 o CCL21 (20 nM) y a los tiempos indicados las lisamos para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de FoxO1 y FoxO3 empleando Abs contra la forma fosforilada en Serina256 de FoxO1 y en Ser253 de FoxO3, empleamos un Ab contra FoxO1 total como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

Además comprobamos que Akt1 es realmente la quinasa responsable de la fosforilación de FoxO inducida por CCR7 en las CDs. Para ello tratamos las células con un inhibidor específico para Akt1 y posteriormente las estimulamos con los ligandos de CCR7 para analizar el efecto que tiene la inhibición de Akt1 sobre la fosforilación de FoxO. Observamos que si Akt1 se encuentra inhibida la fosforilación de FoxO inducida por CCR7 no se produce (Figura 20), lo que indica que es necesario que CCR7 active Akt1 para que se fosfore FoxO. Esto sitúa la regulación negativa de un factor de transcripción implicado en la apoptosis de las CDs bajo el control del módulo de señalización implicado en regular la supervivencia celular, reforzando la idea de la existencia de diferentes vías activadas por CCR7 implicadas en la regulación de funciones distintas (Figura 5).

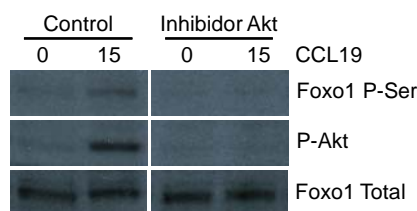


Figura 20. La fosforilación de FoxO1 inducida por CCR7 es dependiente de la activación de Akt1. Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 1 hora en presencia de un inhibidor específico de Akt1/2 (5 μM) o de DMSO (Control). A continuación estimulamos las CDs con CCL19 (20 nM) durante 15 minutos. Finalmente las lisamos para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de FoxO1, para lo cual empleamos Abs contra fosfo-FoxO1 (Ser256), contra fosfo-Akt1 (Ser473), para verificar que el inhibidor de Akt1 funciona, y contra FoxO1 total como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

A continuación quisimos comprobar si este aumento en la fosforilación realmente se correlaciona con una disminución en los niveles de FoxO nuclear y, por tanto, en la inhibición de la actividad de estos factores de transcripción. Para ello las CDs se mantuvieron en ausencia de suero durante 6 horas para inducir la traslocación de FoxO al núcleo, donde ejerce su función pro-apoptótica, y posteriormente fueron estimuladas o no con CCL19 o CCL21 para determinar el efecto de las quimioquinas sobre la localización de FoxO. A continuación realizamos experimentos de

RESULTADOS

fraccionamiento subcelular para aislar la fracción nuclear y la citoplasmática, y analizamos mediante *Western Blot* el nivel tanto de FoxO1 como de FoxO3 en ambas fracciones. De este modo demostramos que las CDs que fueron estimuladas con las quimioquinas presentan menor nivel de FoxO nuclear que los controles que no fueron estimulados (Figura 21). Observamos que la estimulación con CCL19 reduce en un 30-40% el nivel nuclear tanto de FoxO1 como de FoxO3 (Figura 21A). La reducción que produjo CCL21 fue algo inferior, aproximadamente un 30% para FoxO1 y un 20% para FoxO3 (Figura 21B).

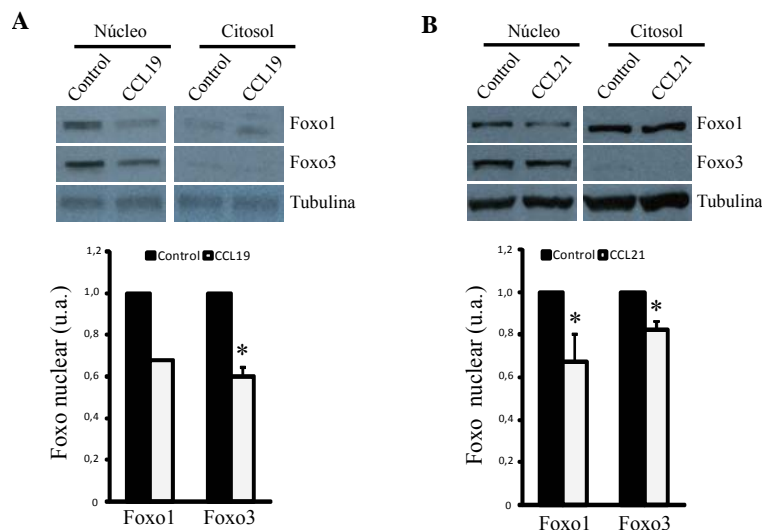


Figura 21. La estimulación de CDs con CCL19 o CCL21 induce la traslocación de FoxO1 y FoxO3 al citoplasma. A y B) Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 5-6 horas para inducir condiciones apoptóticas en las cuales FoxO se encuentre en el núcleo, ya sea en ausencia de estímulo (Control) o bien en presencia de **A)** CCL19 (20 nM) o de **B)** CCL21 (20 nM). Pasado este tiempo seguimos el protocolo de fraccionamiento nuclear (*ver Materiales y Métodos*) y analizamos mediante *Western Blot* la localización de FoxO1 y FoxO3 en la fracción nuclear y citoplasmática de CDs tratadas o no con CCL19 o CCL21. Para ello empleamos Abs contra FoxO1 y FoxO3 total, y contra α -Tubulina como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestran las gráficas que representan la variación en la localización nuclear de FoxO1/3 producida por la estimulación con CCL19 **A)** o CCL21 **B)**, los valores mostrados se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos y, en todos los casos, se encuentran referidos al nivel de FoxO1/3 nuclear en las CDs control. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

C. CCR7 inhibe GSK3 β a través de la vía de PI3K/Akt1 que regula la supervivencia de las CDs

C.1 CCR7 regula la actividad de GSK3 β mediante una vía que implica la activación de G $_{\alpha i/\beta\gamma}$ / PI3K / Akt1

Sabiendo que GSK3 β es una molécula pro-apoptótica y que su actividad está regulada por CCR7, nos planteamos caracterizar los mecanismos de señalización implicados en la fosforilación de GSK3 β inducida por CCR7. Previamente se demostró la existencia de un módulo de señalización que regula la supervivencia inducida por CCR7 en el cual está implicada la activación de proteínas G de la familia $\alpha_i/\beta\gamma$, de PI3K y de Akt1 (Sanchez-Sanchez et al. 2004). Dada la implicación de GSK3 β en apoptosis y puesto que Akt1 es una de las quinasas que pueden fosforilar e inhibir a GSK3 β (Cross et al. 1995), comenzamos por estudiar el efecto de esta vía sobre GSK3 β .

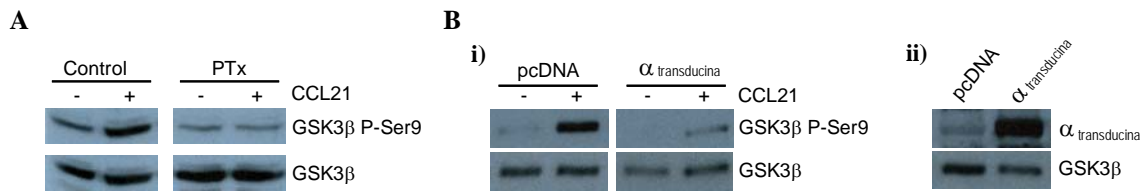


Figura 22. La fosforilación de GSK3 β inducida por CCR7 es dependiente de la activación de proteínas G heterotrímicas de la familia $\alpha_{i/0}$ y, más concretamente del dímero $\beta\gamma$ del heterotrímico. **A)** Mantuvimos las CDs en RPMI 10% FCS durante 3 horas en presencia de PTX (100 ng/ml) o de DMSO (Control). Pasado este tiempo lavamos las CDs y las mantuvimos en RPMI 0,1% BSA durante 30 minutos, tras lo cual las estimulamos CCL21 (20 nM) durante 5 minutos. Finalmente lisamos las CDs para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de GSK3 β , para lo cual empleamos Abs contra fosfo-GSK3 β (Ser9) y contra GSK3 β total como control de carga. **B)** Las CDs fueron nucleofectadas con el vector pcDNA o con α transducina. 15-18 horas después de la transfección recogimos las CDs y las mantuvimos en RPMI 0,1% BSA durante 30 minutos, tras lo cual las estimulamos con CCL21 (20 nM) 5 minutos y posteriormente las lisamos para analizar la fosforilación de GSK3 β por *Western Blot* empleando Abs contra fosfo-GSK3 β (Ser9) y contra GSK3 β total como control de carga **(i)**. También empleamos un Ab contra α transducina para verificar la expresión del vector **(ii)**. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

Para determinar si la fosforilación de GSK3 β es dependiente de proteínas G de la familia $\alpha_{i/0}$ las CDs fueron tratadas con toxina pertúsica (PTX). Esta toxina ADP-ribosila proteínas de la familia $\alpha_{i/0}$ inhibiéndolas e impidiendo su disociación del dímero $\beta\gamma$. Esto implica que el tratamiento con PTX produce la inhibición tanto de la subunidad α como de la $\beta\gamma$. La activación de CCR7 en CDs tratadas con PTX no induce fosforilación de GSK3 β (Figura 22A), lo cual implica que para que CCR7 fosforile GSK3 β es necesario que se activen proteínas G heterotrímicas de la familia $\alpha_{i/0}$. Tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ pueden activar diferentes efectores, pero el tratamiento con PTX no nos permite determinar si es la subunidad α o el dímero $\beta\gamma$ el implicado en la fosforilación de GSK3 β . Para abordar esta cuestión empleamos otra aproximación experimental que consiste en nucleofectar las CDs con un plásmido que codifica para α transducina. La sobreexpresión de esta subunidad α de las proteínas G permite secuestrar al dímero $\beta\gamma$, bloqueando así la señalización inducida por el dímero $\beta\gamma$ pero no la inducida por la subunidad $\alpha_{i/0}$. Estimulamos o no con CCL21 las CDs que expresan α transducina, o el vector control (pcDNA), y analizamos la fosforilación de GSK3 β . La inhibición de la actividad del dímero $\beta\gamma$ produjo una reducción considerable en el nivel de fosforilación de GSK3 β (Figura 22B), indicando que el dímero $\beta\gamma$ está implicado en la inhibición de GSK3 β inducida por CCR7.

A continuación analizamos si la vía de PI3K/Akt1 está implicada en la inhibición de GSK3 β inducida por CCR7, especialmente teniendo en cuenta que Akt1 es uno de los principales reguladores de la actividad de GSK3 (Cross et al. 1995). Para ello las CDs fueron primero tratadas con LY294002, un inhibidor de PI3Ks, o con un inhibidor específico de Akt1, y posteriormente estimuladas con CCL19/CCL21. El tratamiento con ambos compuestos produce una inhibición prácticamente total de la activación de Akt1 inducida por CCR7 (Figura 23A y B), así como una considerable reducción en la fosforilación de GSK3 β . Esto indica que la inhibición de GSK3 β inducida por CCR7 depende de la vía de PI3K/Akt1. Cabe destacar que a pesar de que la inhibición de PI3K/Akt1 es total, aún se observa cierta fosforilación de GSK3 β , lo cual sugiere la existencia de otra quinasa implicada en la fosforilación de la Ser9 de GSK3 β en las CDs estimuladas con CCL19/21.

RESULTADOS

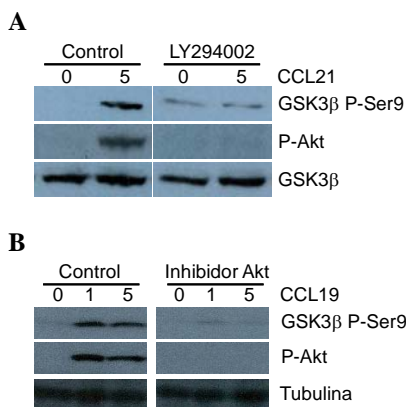


Figura 23. La fosforilación de GSK3β inducida por CCR7 es dependiente de la activación de la vía de PI3K/Akt. A) Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 1 hora en presencia de un inhibidor de PI3K, LY294002 (100 μ M), o de DMSO (Control). Pasado este tiempo estimulamos las CDs con CCL21 durante 5 minutos y las lisamos para analizar por *Western Blot* la fosforilación de GSK3β. **B)** Las CDs se mantuvieron 1 hora en RPMI 0,1% BSA en presencia de un inhibidor específico de Akt1/2 (5 μ M) o de DMSO (Control). A continuación estimulamos las CDs con CCL19 (20 nM) durante 5 minutos y las lisamos para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de GSK3β. Para determinar la fosforilación de GSK3β, tanto en **A)** como en **B)**, empleamos Abs contra fosfo-GSK3β (Ser9), contra fosfo-Akt1 (Ser473), para verificar que los inhibidores han funcionado, y contra GSK3β total o α -Tubulina como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

El LY294002 es un inhibidor general de PI3K, por tanto hemos demostrado que la actividad de PI3K es necesaria para que CCR7 pueda activar una vía que involucra a Akt1 y GSK3β. Sin embargo, desconocemos si todas las isoformas de PI3K ejercen el mismo efecto sobre Akt1/GSK3β o si son isoformas específicas las implicadas en la activación de esta vía. A continuación empleamos inhibidores específicos para diversas isoformas de PI3K con el objetivo de determinar si existe alguna diferencia funcional entre estas isoformas en lo relacionado con la activación de la vía Akt1/GSK3β. Para ello las CDs fueron tratadas con DMSO, como control, o con inhibidores específicos para PI3K α , PI3K β y PI3K γ . A continuación las CDs se estimularon con CCL21 y se lisaron para determinar el efecto de estos inhibidores sobre la fosforilación de Akt1 y GSK3β.

Observamos que la estimulación con CCL21 produce un aumento considerable en la fosforilación de ambas quinasas en las CDs empleadas como control, pero el tratamiento con el inhibidor de PI3K α impide que se produzca la fosforilación de Akt1 y GSK3β inducida por CCR7 (Figura 24). En CDs tratadas con el inhibidor de PI3K β observamos que la estimulación con CCL21 induce un aumento en la fosforilación tanto de Akt como de GSK3β, aunque este incremento parece menor que en las CDs control, especialmente en lo que se refiere a la fosforilación de Akt1 (Figura 24). Este resultado puede llevarnos a proponer que PI3K β no está implicada en la activación de la vía Akt1/GSK3β o bien que ni siquiera esté siendo activada por CCR7, sin embargo hay que señalar que hasta el momento no disponemos de un control que nos permita demostrar que el inhibidor de PI3K β esté funcionando realmente, con lo cual no podemos sacar ninguna conclusión sobre el efecto de esta isoforma hasta que no realicemos los experimentos de control necesarios. En las CDs tratadas con el inhibidor de PI3K γ , Akt1 no se fosforiló, lo cual demuestra un papel esencial de la activación de PI3K γ en la fosforilación de Akt1 inducida por CCR7 en CDs. Sin embargo, a pesar del potente efecto de este inhibidor sobre la activación de Akt1, aún se observó un ligero aumento en la fosforilación de GSK3β (Figura 24). Este resultado, unido al obtenido al tratar las CDs con LY294002 o con el inhibidor de Akt1 (Figura 23), indica la existencia de otra/s molécula/s activada/s por CCR7 que puede/n fosforilar el residuo de Ser9 de GSK3β, aparte de Akt. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que tras la estimulación de CCR7 se activan tanto PI3K α como PI3K γ y que son necesarias para la activación de Akt1 y la inhibición de GSK3β.

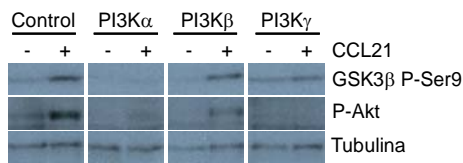


Figura 24. La fosforilación de GSK3 β inducida por CCR7 depende de la activación de PI3K α y PI3K γ . Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 1 hora en presencia de inhibidores específicos de PI3K α (250 nM), PI3K β (1 μ M) y PI3K γ (10 μ M), o bien de DMSO (Control). Pasado este tiempo estimulamos las CDs con CCL21 durante 5 minutos y las lisamos para analizar por *Western Blot* la fosforilación de GSK3 β , para lo cual empleamos Abs contra fosfo-GSK3 β (Ser9), contra fosfo-Akt1 (Ser473), para verificar que los inhibidores han funcionado, y contra α -Tubulina como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 2 realizados).

C.2 La inhibición de GSK3 inducida por CCR7 es independiente de los módulos que regulan la quimiotaxis y la velocidad de las CDs

En las CDs CCR7 activa dos módulos de señalización independientes capaces de regular tanto la velocidad de migración de las CDs como la quimiotaxis hacia CCL19/CCL21 (Riol-Blanco et al. 2005). La activación de las MAPKs está implicada en regular la quimiotaxis pero no la velocidad migratoria, siendo la activación de Pyk2 esencial para que CCR7 pueda incrementar la velocidad de migración de las CDs (Figura 5). Cabe señalar que la activación de Pyk2 inducida por CCR7 es independiente de la activación de proteínas G heterotriméricas de la familia $\alpha_{i/0}$, puesto que depende de la activación de proteínas G de la familia $\alpha_{12/13}$ (resultados sin publicar). Se ha descrito que las MAPKs pueden regular la actividad de GSK3 (Goold et al. 2005), por tanto, decidimos analizar si ERK1/2 y JNK, dos moléculas de la familia de las MAPKs que son claves para la inducción de quimiotaxis por CCR7, están implicadas en la inhibición de GSK3 β . Para ello las CDs fueron tratadas con inhibidores específicos para ERK1/2 y JNK, UO126 y SP600, respectivamente. Posteriormente, se estimularon con los ligandos de CCR7 y se analizó si la inhibición de ERK1/2 o JNK afecta a la fosforilación de GSK3 β inducida por las quimioquinas (Figura 25). Observamos que CCR7 aún es capaz de inducir la inhibición de GSK3 β en CDs tratadas con los inhibidores de ERK1/2 (Figura 25A) o JNK (Figura 25B), lo cual indica que estas MAPKs no están implicadas en la regulación de la actividad de GSK3 mediada por CCR7.

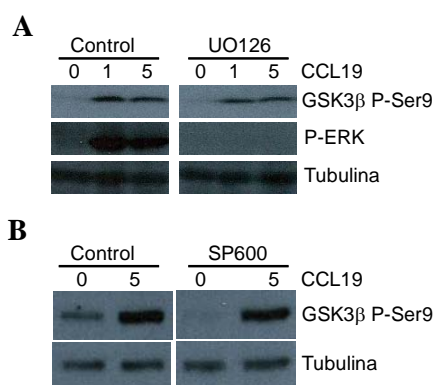


Figura 25. La fosforilación de GSK3 β inducida por CCR7 es independiente de la activación de ERK1/2 y de JNK. A) Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 1 hora en presencia de un inhibidor de ERK1/2, UO126 (5 μ M), o de DMSO (Control). Pasado este tiempo estimulamos las CDs con CCL21 (20 nM) durante los tiempos indicados y las lisamos para analizar por *Western Blot* la fosforilación de GSK3 β . Para ello empleamos Abs contra fosfo-GSK3 β (Ser9), contra fosfo-ERK1/2 (Thr202Thr185/Tyr204Tyr187), para verificar que el UO126 ha funcionado, y contra α -Tubulina como control de carga. **B)** Las CDs se mantuvieron 1 hora en RPMI 0,1% BSA en presencia de un inhibidor específico de JNK, SP600125 (50 μ M), o de DMSO (Control). A continuación estimulamos las CDs con CCL19 (20 nM) durante 5 minutos y las lisamos para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de GSK3 β , empleando Abs contra fosfo-GSK3 β (Ser9) y contra α -Tubulina como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

RESULTADOS

También analizamos la implicación de moléculas que participan en la regulación de la velocidad de migración de las CDs en la inhibición de GSK3 β . Para ello empleamos en primer lugar siRNAs específicos para las subunidades α_{12} y α_{13} de las proteínas G heterotriméricas. La reducción de la expresión de estas subunidades α en CDs (Figura 26A) no tiene ningún efecto sobre la fosforilación de GSK3 β inducida por CCR7 (Figura 26B), indicando que estas proteínas G heterotriméricas de la familia $\alpha_{12/13}$ no participan en la vía de señalización activada por CCR7 que conlleva a la inhibición de GSK3 β .

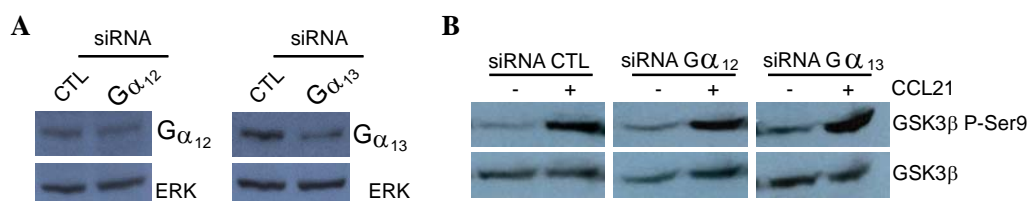


Figura 26. La fosforilación de GSK3 β inducida por CCR7 es independiente de la activación de las proteínas G heterotriméricas α_{12} y α_{13} . Las CDs fueron nucleofectadas con siRNAs específicos para las subunidades α_{12} y α_{13} de proteínas G heterotriméricas y las CDs se recogieron 48 horas después de la transfección. **A)** Lisamos CDs nucleofectadas para analizar por *Western Blot* el nivel de expresión de α_{12} y α_{13} y confirmar que los siRNAs redujeron la expresión de estas moléculas, para ello empleamos Abs específicos contra α_{12} y α_{13} , y contra ERK2 total como control de carga. **B)** Las CDs nucleofectadas se mantuvieron 30 minutos en RPMI 0,1% BSA, posteriormente se estimularon con CCL21 (20 nM) durante 5 minutos y se lisaron para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de GSK3 β empleando Abs contra fosfo-GSK3 β (Ser9) y contra GSK3 β total como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

En segundo lugar analizamos el papel de Pyk2 en la inhibición de GSK3 β inducida por CCR7. Para ello las CDs fueron nucleofectadas con PRNK, una construcción que codifica la región C-terminal de Pyk2 que actúa como un dominante negativo de esta quinasa (Ivankovic-Dikic et al. 2000). La sobreexpresión de esta construcción no afecta en gran medida a la inhibición de GSK3 β inducida por CCR7 (Figura 27), indicando que Pyk2 no está implicado en la vía activada por CCR7 que fosforila e inhibe a GSK3 β . En su conjunto estos resultados muestran que las vías de señalización que emplea CCR7 para regular la quimiotaxis y la velocidad de migración de las CDs no participan en la inhibición de GSK3 β , siendo la ruta de señalización que regula la supervivencia la principal implicada en regular la actividad de GSK3 β (Figura 5).

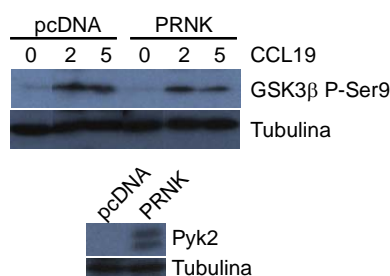


Figura 27. La fosforilación de GSK3 β inducida por CCR7 es independiente de la activación de Pyk2. Las CDs fueron nucleofectadas con el vector pcDNA o con PRNK. 15-18 horas después de la transfección recogimos las CDs y las mantuvimos en RPMI 0,1% BSA durante 30 minutos, tras lo cual las estimulamos con CCL19 (20 nM) durante los tiempos indicados y posteriormente las lisamos para analizar la fosforilación de GSK3 β por *Western Blot* empleando Abs contra fosfo-GSK3 β (Ser9) y contra α -tubulina como control de carga (parte superior). También empleamos un Ab contra Pyk2 para verificar la expresión del vector (parte inferior). (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

C.3 PKC está implicada en la inhibición de GSK3β inducida por CCR7

Se ha descrito que el residuo de Ser9 de GSK3β, cuya fosforilación conduce a la inhibición de la actividad de esta molécula, puede ser fosforilado por múltiples quinasas entre las cuales, aparte de PKB/Akt (Cross et al. 1995), destacan PKA (Fang et al. 2000; Li et al. 2000), PKC (Goode et al. 1992) o p70S6K (Sutherland et al. 1993). Anteriormente demostramos que en presencia de inhibidores de Akt se inhibe la fosforilación de GSK3β inducida por CCR7 (Figura 23). Sin embargo, a pesar de que Akt está completamente inhibida, ya que no se fosforila en absoluto al estimular las CDs con las quimioquinas, sí que se puede observar un ligero aumento en la fosforilación de GSK3β. Esto indica que pueden existir otras moléculas activadas por CCR7 que son capaces de fosforilar a GSK3β. Dado que anteriormente descartamos que GSK3β estuviera siendo regulada por las MAPKs (Figura 25) o por moléculas que regulan la velocidad de migración de las CDs (Figura 26 y 27), decidimos analizar si otras quinasas como PKCs, que pueden fosforilar el residuo de Ser9 de GSK3β, están implicadas en la regulación de la actividad de GSK3β mediada por CCR7.

Para determinar la implicación de PKC en la inhibición de GSK3β, las CDs fueron tratadas con dos inhibidores generales de PKC diferentes, Ro-31-8220 y GF-109203X, y posteriormente se estimularon con CCL19/CCL21. Observamos que en presencia de los inhibidores de PKC la activación de CCR7 no produce fosforilación de GSK3β (Figura 28), lo cual indica que un mecanismo adicional por el cual CCR7 inhibe GSK3β puede ser a través de la activación de PKC.

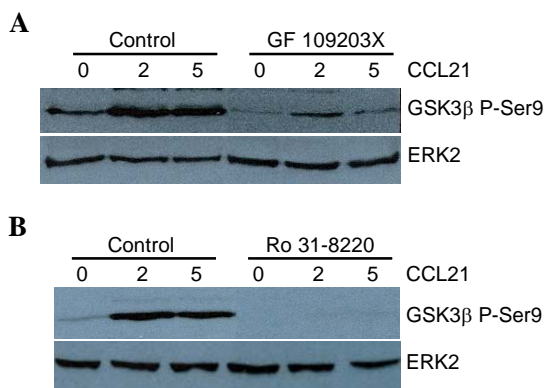


Figura 28. La activación de PKCs inducida por CCR7 también regula la fosforilación de GSK3β en las CDs.

A) Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 1 hora en presencia de un inhibidor general de PKCs, GF-109203X (3,5 μM), o de DMSO (Control). Pasado este tiempo estimulamos las CDs con CCL21 (20 nM) durante los tiempos indicados y las lisamos para analizar por *Western Blot* la fosforilación de GSK3β, empleando Abs contra fosfo-GSK3β (Ser9) y contra ERK2 total como control de carga. **B)** Las CDs se mantuvieron 1 hora en RPMI 0,1% BSA en presencia de un inhibidor general de PKCs, Ro-31-8220 (1 μM), o de DMSO (Control). A

continuación estimulamos las CDs con CCL21 (20 nM) durante los tiempos indicados y las lisamos para analizar mediante *Western Blot* el nivel de fosforilación de GSK3β empleando Abs contra fosfo-GSK3β (Ser9) y contra ERK2 total como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

Resumiendo, los resultados anteriores muestran que la activación de CCR7 produce la inhibición de GSK3β principalmente a través de una vía que implica la activación de proteínas G heterotriméricas de la familia α_{i/o}, de PI3Kα/γ y de Akt1 (Figura 29), demostrando también que la actividad del dímero βγ participa en la inhibición de GSK3β. También observamos que la actividad de PKC se requiere para que CCR7 induzca una completa fosforilación de GSK3β en Ser9. Sin embargo, ni las MAPKs ERK1/2 ni JNK, que son esenciales para regular la quimiotaxis, ni la vía que activa proteínas G heterotriméricas de la familia α_{12/13} y Pyk2, que regula la velocidad, participan en la inhibición de GSK3β inducida por CCR7 en CDs (Figura 29).

RESULTADOS

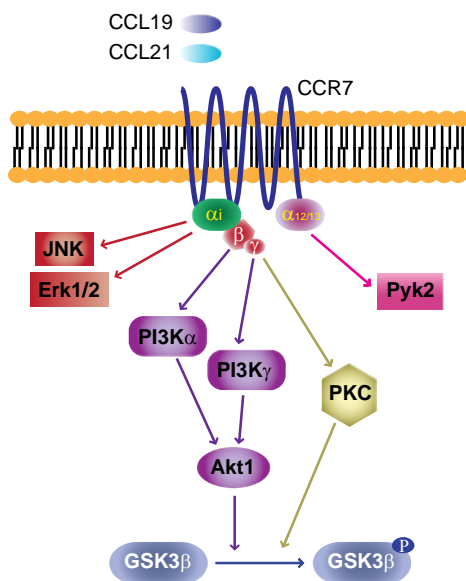


Figura 29. Modelo de las vías de señalización implicadas en la fosforilación de GSK3β inducida por CCR7. La estimulación de las CDs con CCL19 o CCL21 induce la activación de múltiples vías de señalización intracelulares. En primer lugar se activan proteínas G heterotriméricas de la familia $\alpha_{i/0}$ y $\alpha_{12/13}$, los resultados muestran que la fosforilación de GSK3β depende de proteínas de la familia $\alpha_{i/0}$ pero no de la $\alpha_{12/13}$. También se activan MAPKs, como ERK1/2 y JNK, y Pyk2, que no están implicadas en la fosforilación de GSK3β. Por el contrario hemos observado que tanto PKC como la vía de PI3K(α/γ)/Akt1 son quinasas activadas por CCR7 en CDs que median la fosforilación inhibitoria de GSK3β en el residuo de Ser9.

C.4 GSK3β no afecta a la fosforilación de Akt1 ni ERK1/2 inducida por CCR7, ni altera la expresión de CCR7 en la membrana

Existen varias referencias en la bibliografía que proponen que algunas de las moléculas que estudiamos anteriormente como posibles reguladoras de la actividad de GSK3β son en realidad efectores de esta quinasa. Así, por ejemplo, se ha descrito que GSK3 puede regular la actividad de las MAPKs ERK1/2 y JNK (Abell et al. 2007; Rehani et al. 2009) e incluso de Akt1 (Takada et al. 2004). Por ello decidimos analizar si en las CDs GSK3 es responsable de la activación de ERK1/2 o Akt1 inducida por CCR7. Para este fin las CDs fueron tratadas con dos inhibidores diferentes de GSK3, inhibidor IX y LiCl, posteriormente se estimularon con CCL19/CCL21 y analizamos mediante *Western Blot* la fosforilación en residuos activadores de ERK1/2 (T202-Y204/T185-Y187) y Akt1 (S473). Observamos que la inhibición de GSK3 no afecta a la activación de ERK1/2 (Figura 30A) ni de Akt1 (Figura 30B) inducida por CCR7 en las CDs, demostrando que ni ERK1/2 ni Akt1 son moléculas efectoras de GSK3 en estas células. Además analizamos si la inhibición de GSK3 altera la expresión de CCR7 en la membrana de las CDs para asegurarnos de que la activación con las quimioquinas se puede producir por igual en CDs no tratadas o tratadas con los inhibidores de GSK3. Para ello las CDs fueron dejadas sin tratar o se trataron con los inhibidores de GSK3 y posteriormente analizamos la expresión de CCR7 en la membrana celular mediante citometría de flujo. Determinamos que la inhibición de GSK3 no altera la expresión de CCR7 en la membrana de las CDs (Figura 30C).

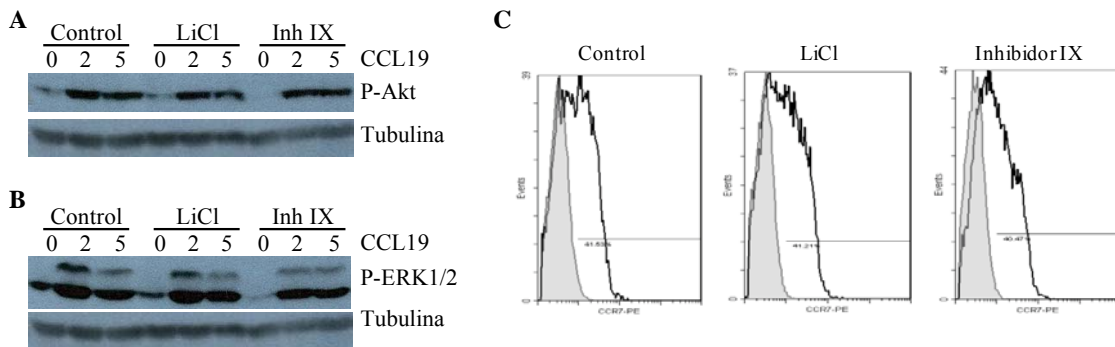


Figura 30. GSK3 no regula la fosforilación de Akt ni de ERK inducida por CCR7, ni afecta a la expresión de CCR7 en la membrana de las CDs. **A-C)** Las CDs se mantuvieron en RPMI 0,1% BSA durante 1 hora en presencia de dos inhibidores de GSK3, LiCl (20 mM) e Inhibidor IX (4 μ M), o sin tratamiento (Control). **A y B)** Pasado este tiempo estimulamos las CDs con CCL19 (20 nM) durante los tiempos indicados y las lisamos para analizar por *Western Blot* la fosforilación de Akt1 y de ERK1/2, empleando Abs contra **A)** fosfo-Akt1 (Ser473), contra **B)** fosfo-ERK1/2 (Thr202Thr185/Tyr204Tyr187) y frente a α -Tubulina como control de carga. **C)** Tras la incubación de las CDs con los inhibidores de GSK3 teñimos CCR7 en la superficie de las células para analizar su expresión en membrana mediante citometría de flujo. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

D. CCR7 regula la expresión de miembros de la familia Bcl-2

En la introducción se mencionó la importancia que tiene la relación entre miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 en la regulación del proceso de apoptosis. Se ha demostrado que CCR7 activa la vía de NF- κ B en las CDs, y que este hecho es de vital importancia para que se produzca el aumento en la supervivencia inducido por CCR7 (Sanchez-Sanchez et al. 2004). Dado que uno de los genes diana de NF- κ B es Bcl-XL (Chen et al. 2000), un miembro pro-supervivencia de la familia Bcl-2, decidimos analizar si CCR7 regula la supervivencia de las CDs alterando la relación entre miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. Para ello las CDs se mantuvieron en RPMI 0,1% BSA en presencia o ausencia de CCL19 y CCL21, pasadas 10 horas se lisaron las células y comparamos el nivel de expresión de Bcl-XL en CDs estimuladas o no con los ligandos de CCR7. Observamos que tanto CCL19 (Figura 31A) como CCL21 (Figura 31B) inducen un aumento significativo en la expresión de Bcl-XL, lo cual apoya los resultados previos que muestran que CCR7 tiene un papel pro-supervivencia en CDs y que la activación de la vía de NF- κ B está implicada en la regulación de esta función, puesto que induce la transcripción de genes pro-supervivencia como Bcl-XL.

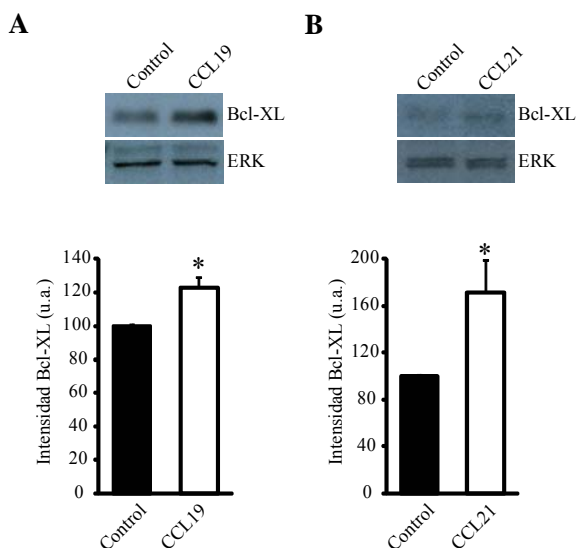


Figura 31. La estimulación con CCL19 o CCL21 produce un aumento en la expresión de Bcl-XL en las CDs. **A y B)** Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 10 horas para inducir condiciones apoptóticas, ya sea en ausencia de estímulo (Control) o bien en presencia de **A)** CCL19 (20 nM) o de **B)** CCL21 (20 nM). Pasado este tiempo lisamos las CDs y analizamos mediante *Western Blot* la expresión de Bcl-XL empleando Abs contra Bcl-XL y contra ERK2 total como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestran las gráficas que representan la variación en la expresión de Bcl-XL inducida con CCL19 **A)** o con CCL21 **B)**. Los valores mostrados se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos y se presentan referidos al nivel de expresión de Bcl-XL en las CDs control. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

RESULTADOS

También se ha descrito que FoxO es un factor de transcripción pro-apoptótico en CDs y que regula la expresión de Bim, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 (Dijkers et al. 2000; Riol-Blanco et al. 2009). Anteriormente en este trabajo demostramos que CCR7 puede regular el estado de fosforilación y la localización nuclear de FoxO (Figura 19 y 21). A continuación nos planteamos si este efecto se refleja sobre la expresión de Bim. Para determinar si este es el caso mantuvimos las CDs 10 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia o ausencia de CCL19 y CCL21, pasado este tiempo lisamos las células y analizamos el nivel de expresión de Bim mediante *Western Blot*. Observamos que la activación de CCR7 tanto con CCL19 (Figura 32A) como con CCL21 (Figura 32B) produce una reducción significativa en el nivel de expresión de Bim, indicando una menor actividad de los factores de transcripción de la familia FoxO, lo cual apoya resultados previos que mostraban que CCR7 induce la traslocación de FoxO al citoplasma.

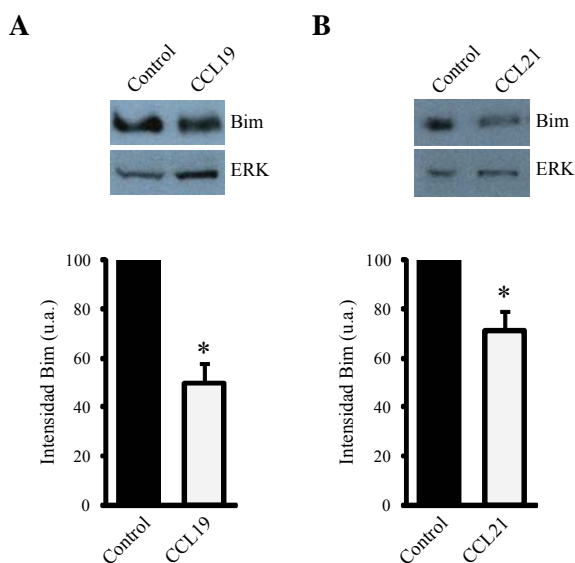


Figura 32. La estimulación con CCL19 o CCL21 produce una reducción en la expresión de Bim en las CDs. A y B) Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 10 horas para inducir condiciones apoptóticas, ya sea en ausencia de estímulo (Control) o bien en presencia de **A)** CCL19 (20 nM) o de **B)** CCL21 (20 nM). Pasado este tiempo lisamos las CDs y analizamos mediante *Western Blot* la expresión de Bim empleando Abs contra Bim y contra ERK2 total como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestran las gráficas que representan la variación en la expresión de Bim inducida con CCL19 **A)** o con CCL21 **B)**. Los valores mostrados se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos y se presentan referidos al nivel de expresión de Bim en las CDs control. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

En conjuntos estos resultados indican que el efecto pro-supervivencia de CCR7 puede ser debido, al menos en parte, a que altera el balance entre miembros pro- o anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. Los resultados apoyan un modelo en el cual CCR7 activa la quinasa Akt1. Esta molécula activa por un lado NF- κ B, como se describió anteriormente (Sanchez-Sanchez et al. 2004), y por otro lado fosforila e inhibe FoxO sacándolo del núcleo (Figura 19 y 21). De este modo CCR7 altera el balance entre la expresión de miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, ya que la activación de NF- κ B produce un aumento en la expresión de Bcl-XL, que es un miembro pro-supervivencia de la familia Bcl-2, y la inhibición de FoxO conlleva a una menor expresión de Bim, que es pro-apoptótico (Figura 33). En su conjunto todos estos cambios inducidos por CCR7 favorecen la supervivencia celular.

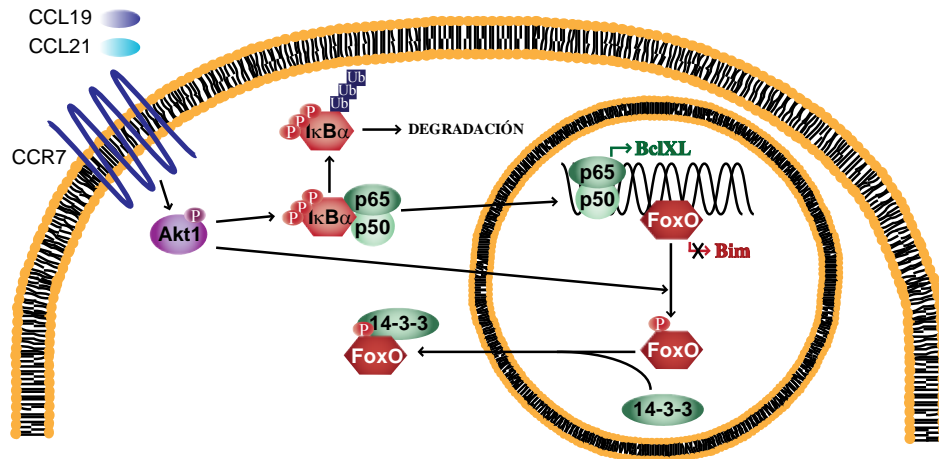


Figura 33. Modelo de las vías de señalización activadas por CCR7 que regulan la supervivencia de las CD. La estimulación de las CD con CCL19 o CCL21 induce la activación Akt1, esta quinasa regula la supervivencia de las CD porque modula la actividad de múltiples moléculas efectoras implicadas en apoptosis. Entre ellas destacamos el efecto de Akt1 sobre la activación de la vía de NF-κB que conduce a un aumento en la expresión de Bcl-XL, un miembro pro-supervivencia de la familia Bcl-2. Por otro lado, la forma activa de Akt1 fosforila factores de transcripción de la familia FoxO creando sitios de unión para las proteínas 14-3-3, que se asocian a éstos y los retienen en el citoplasma impidiendo su actividad transcripcional y, por tanto, reduciendo la expresión de genes pro-apoptóticos como Bim.

E. GSK3β regula la vía de NFκB en CD

E.1 La inhibición de GSK3 altera la localización de NF-κB regulando el nivel de IκB

En este trabajo hemos definido a GSK3 como una molécula pro-apoptótica en CD cuya actividad puede ser regulada por CCR7. Sin embargo, hasta el momento desconocemos las moléculas efectoras de GSK3 que participan en el proceso de apoptosis. Dado que se ha descrito que GSK3 puede regular la actividad de NF-κB (Hoeflich et al. 2000) y que NF-κB es un factor de transcripción cuya actividad ha sido relacionada con el aumento en la supervivencia de las CD inducido por CCR7 (Sanchez-Sanchez et al. 2004), nos planteamos analizar el efecto que tiene GSK3 sobre NF-κB en CD. Como mencionamos anteriormente GSK3 puede ser una molécula pro- o anti-apoptótica dependiendo del contexto celular y del estímulo apoptótico (Schwabe et al. 2002; Sanchez et al. 2003; Beurel et al. 2006). De un modo similar se ha descrito que GSK3 puede actuar activando o inhibiendo la vía de NF-κB (Hoeflich et al. 2000; Sanchez et al. 2003), lo que hace del papel de GSK3 en la activación de la vía de NF-κB un tema bastante controvertido. Se han propuesto múltiples mecanismos mediante los cuales GSK3 puede regular la actividad de NF-κB tanto positiva como negativamente. Algunos autores sostienen que GSK3 regula la localización nuclear de NF-κB, ya sea actuando sobre IKK, IκB, p65 o incluso sobre precursores de NF-κB como p105 (Demarchi et al. 2003; Sanchez et al. 2003; Buss et al. 2004; Rao et al. 2004; Wilson et al. 2008). Sin embargo, otros autores sostienen que GSK3 no altera la localización nuclear de NF-κB, sino que regula su actividad afectando a su capacidad de unión a DNA, su asociación con otros reguladores transcripcionales o alterando el efecto de NF-κB sobre promotores concretos (Schwabe et al. 2002; Martin et al. 2005; Ougolkov et al. 2005; Steinbrecher et al. 2005; Ougolkov et al. 2007).

RESULTADOS

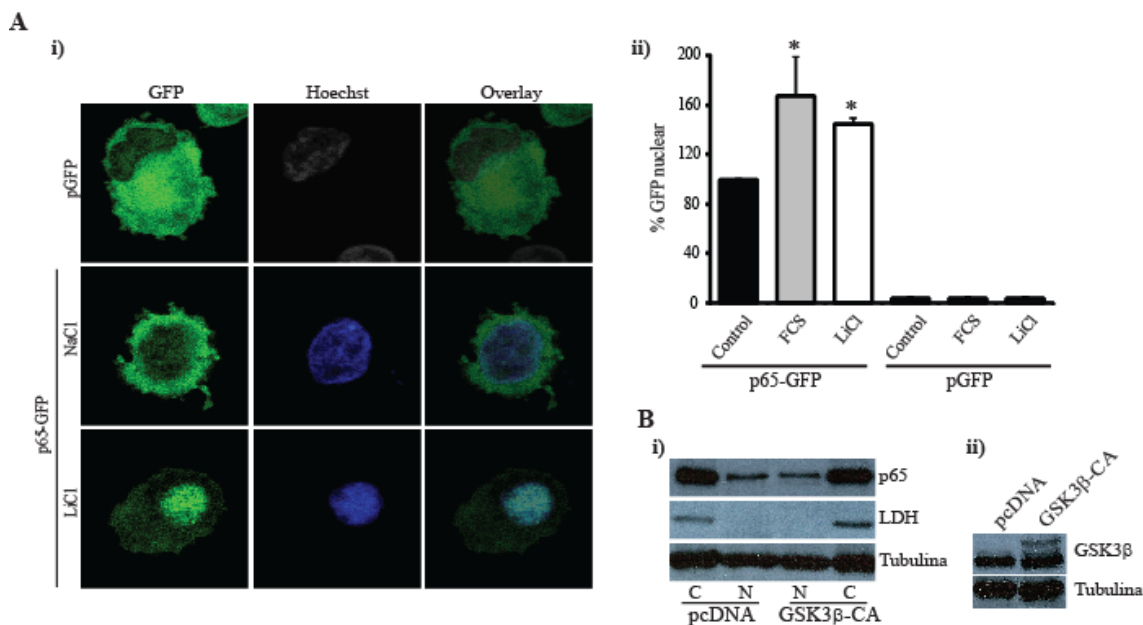


Figura 34. La inhibición de GSK3 aumenta la traslocación al núcleo de NF- κ B. **A)** Las CDs fueron nucleofectadas con pGFP o p65-GFP, 15-18 horas después de la transfección recogimos las células y las mantuvimos 90 minutos en RPMI 0,1% BSA en presencia de NaCl (Control) o de LiCl, para inhibir GSK3 (ambos a 20 mM). Además empleamos CDs mantenidas en RPMI 10% FCS como control de supervivencia. Pasado el tiempo indicado las CDs se colocaron sobre cubreobjetos recubiertos con PLL y se procesaron para inmunofluorescencia realizando la tinción con Hoechst 33342 para poder identificar el núcleo celular y determinar si la GFP se localiza en el núcleo o en el citoplasma. **(i)** Se muestran imágenes representativas de CDs tratadas con NaCl o LiCl y **(ii)** una gráfica que representa el porcentaje de CDs que presentan GFP localizada en el núcleo referido al porcentaje obtenido en las CDs control. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$). **B)** Las CDs fueron nucleofectadas con pcDNA o con GSK3 β -CA. 14-16 horas después de la transfección seguimos el protocolo de fraccionamiento nuclear (ver materiales y métodos) y analizamos mediante *Western Blot* la localización de p65 en la fracción nuclear y citoplasmática de las CDs nucleofectadas, empleando Ab contra p65, contra LDH como control del fraccionamiento y contra α -Tubulina como control de carga **(i)**. La expresión de GSK3 β -CA se confirmó realizando un *Western Blot* con Abs contra GSK3 β total y contra α -Tubulina como control de carga **(ii)**. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

Dada la controversia existente sobre si GSK3 puede regular o no la localización nuclear de NF- κ B, y puesto que no hay información previa sobre si GSK3 regula o no la actividad de NF- κ B en CDs, nos decidimos a analizar en primer lugar si GSK3 afecta a la traslocación de NF- κ B al núcleo en condiciones pro-apoptóticas. Para ello nucleofectamos las CDs con una construcción que codifica la subunidad p65 de NF- κ B fusionada a la proteína verde fluorescente (p65-GFP). Este procedimiento nos permite determinar la localización de p65 de una manera sencilla observando si la GFP se encuentra concentrada en el núcleo celular o si se encuentra localizada principalmente en el citoplasma (Figura 34A). Como control las CDs fueron nucleofectadas con un plásmido que codifica para GFP (pGFP). Para determinar el efecto de GSK3 sobre la localización de p65 las CDs nucleofectadas con las construcciones descritas anteriormente fueron mantenidas durante 6 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia de LiCl (para evaluar el papel de GSK3) o de NaCl (como control). Además empleamos CDs mantenidas RPMI 10% FCS como control de factores que inducen supervivencia celular. Los resultados obtenidos muestran que la localización del plásmido control, pGFP, que localiza predominantemente en el citosol, no se ve alterada con los distintos tratamientos empleados. Sin embargo, sí se producen cambios en la localización de la proteína de fusión p65-GFP (Figura 34A). Observamos que la presencia de FCS aumenta el porcentaje de CDs que tienen la subunidad p65-GFP localizada en el núcleo con

respecto a las CDs control (Figura 34A), lo cual es lo esperado dado que el suero contiene factores pro-supervivencia que activan NF- κ B. Como se observa en la Figura 34A el tratamiento con LiCl tiene un efecto similar al del suero, aumentado la localización nuclear de p65. Este resultado indica que GSK3 puede regular la localización de p65 en CDs y que, por tanto, podría estar regulando la actividad de NF- κ B a través del control de la localización de este factor. Además los resultados muestran que la inhibición de GSK3 produciría la activación de NF- κ B, como cabe esperar teniendo en cuenta que NF- κ B es un factor de transcripción pro-supervivencia y, sin embargo, GSK3 es una quinasa pro-apoptótica. Para confirmar que realmente GSK3 es capaz de regular la traslocación al núcleo de NF- κ B empleamos una aproximación experimental diferente a la anterior. Nucleofectamos una forma constitutivamente activa de GSK3 β (GSK3 β -CA) para comprobar si un aumento en la actividad de GSK3 reduciría la presencia de p65 en el núcleo, que sería el resultado esperado si nuestra hipótesis de que la inhibición de GSK3 favorece la traslocación de NF- κ B al núcleo es cierta. Por tanto, nucleofectamos las CDs con GSK3 β -CA o pcDNA como control, y 18 horas después realizamos experimentos de fraccionamiento subcelular, para separar las fracciones proteicas de núcleo y citoplasma, y analizamos mediante *Western Blot* el nivel de p65 en ambas fracciones. Realizamos el *immunoblot* también para LDH (*Láctico DesHidrogenasa*), que es una proteína de localización citosólica que empleamos como control de que no existe contaminación citosólica en la fracción nuclear en ninguna de las muestras (Figura 34B), y para tubulina como control de carga. Los resultados muestran que la expresión de GSK3 β -CA conlleva a una disminución del nivel de p65 nuclear (Figura 34B). La densitometría de este experimento indica una reducción del 25% de p65 nuclear en CDs que expresan GSK3 β -CA con respecto a las CDs control, lo cual es una reducción considerable teniendo en cuenta el bajo nivel de expresión de GSK3 β -CA obtenido en este experimento. En la Figura 34B se muestra un experimento representativo de tres realizados en los cuales la media obtenida en la reducción de p65 nuclear en CDs que expresan GSK3 β -CA es de un 30%.

Estos resultados demuestran que si GSK3 β se encuentra activa, como ocurre en condiciones pro-apoptóticas en las CDs, uno de los efectos de esta quinasa es impedir que NF- κ B se transporte al núcleo. Sin embargo, en presencia de algún estímulo pro-supervivencia, como son CCL19 o CCL21, GSK3 β es fosforilada en el residuo de Ser9 y, por tanto, inhibida, lo cual favorece la traslocación al núcleo de NF- κ B, donde actúa transcribiendo genes pro-supervivencia. Por tanto podemos concluir que en CDs GSK3 β puede regular la localización de NF- κ B aunque desconocemos el mecanismo empleado.

Hasta el momento se han propuesto diversos mecanismos que pueden regular la traslocación de NF- κ B al núcleo. Algunos implican la degradación de I κ B ya sea afectando a la actividad de IKK o a través de otras vías de señalización (Sanchez et al. 2003; Rao et al. 2004; Wilson et al. 2008), mientras que otros proponen que GSK3 regula directamente por fosforilación p65 e incluso precursores de NF- κ B como p105 (Demarchi et al. 2003; Buss et al. 2004). La vía clásica que induce la traslocación de p65 al núcleo se produce mediante la fosforilación y posterior degradación de I κ B, esta proteína se asocia a p65 reteniéndolo en el citoplasma e inhibiendo su actividad. Cuando se degrada I κ B p65 queda libre y puede ser transportado al núcleo donde ejerce su actividad transcripcional (Karin et al. 2000). Por esta razón testamos en primer lugar si la inhibición de GSK3 tiene alguna consecuencia sobre la degradación de I κ B. Para ello las CDs fueron tratadas con

RESULTADOS

tres inhibidores diferentes de GSK3 y mantenidas en RPMI 0,1% BSA durante dos horas, tras lo cual se lisaron y analizamos el nivel de I κ B mediante *Western Blot*. Observamos que en presencia de los distintos inhibidores de GSK3 el nivel de I κ B es menor que en el control (Figura 35). Esta reducción en el nivel de I κ B puede explicar que cuando GSK3 se encuentre inhibida observemos más p65 en el núcleo. Sin embargo, si GSK3 está activa, esta quinasa estabiliza el nivel de I κ B impidiendo que p65 sea transportado al núcleo.

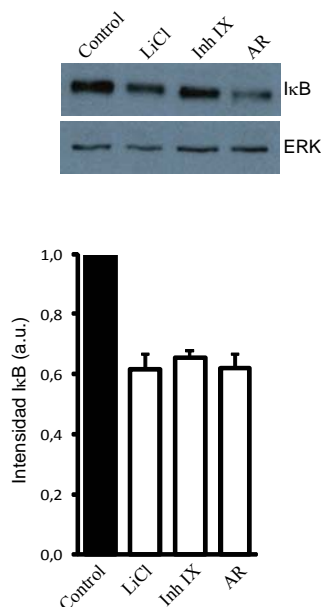


Figura 35. La inhibición de GSK3 produce una reducción en el nivel de I κ B en las CD4. Mantuvimos las CD4 en RPMI 0,1% BSA durante 90 minutos con tres inhibidores diferentes de GSK3, LiCl (20 mM), Inhibidor IX (4 μ M) o AR-A014418 (10 μ M), o bien sin tratamiento como control. A continuación se lisaron y analizamos mediante *Western Blot* el nivel de I κ B empleando Abs contra I κ B y contra ERK2 total como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestran las gráficas que representan la variación en el nivel de I κ B en CD4 tratadas con los inhibidores de GSK3 referidos al nivel de expresión de I κ B en las CD4 control. Los valores se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * p <0,05).

En la vía de activación clásica de NF- κ B, se activa el complejo IKK que fosforila a I κ B favoreciendo su degradación. En las CD4 se ha descrito que la estimulación con CCL19 y CCL21 induce degradación de I κ B y que este proceso es dependiente de la activación de PI3K/Akt1 (Sanchez-Sanchez et al. 2004). Dado que en este trabajo intentamos caracterizar mejor los mecanismos por los cuales CCR7 regula la supervivencia de las CD4 y la implicación de GSK3 en este proceso, y puesto que la vía clásica para la degradación de I κ B requiere la activación del complejo IKK (Karin et al. 2000), decidimos testar si la estimulación con CCL19/CCL21 puede activar IKK.

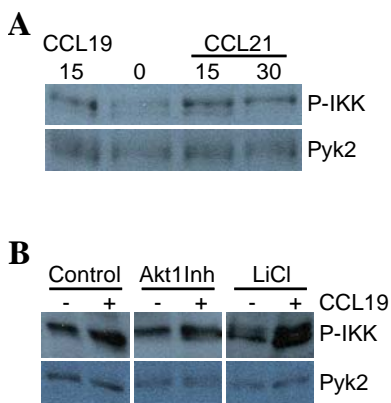


Figura 36. La estimulación con CCL19 o CCL21 activa el complejo IKK, y esta activación es independiente de la actividad de Akt1 o de GSK3. **A)** Mantuvimos las CD4 en RPMI 0,1% BSA durante 30 minutos, tras lo cual fueron estimuladas con CCL19 o CCL21 (20 nM) durante los tiempos indicados. Posteriormente lisamos las CD4 y analizamos el nivel de fosforilación de IKK empleando Abs específicos contra fosfo-IKK α (Ser176/180) y contra Pyk2 como control de carga. **B)** Mantuvimos las CD4 en RPMI 0,1% BSA durante 1 hora en presencia de un inhibidor específico de Akt1/2 (5 μ M), de LiCl (20 mM) o sin tratamiento (Control). Pasado este tiempo estimulamos las CD4 con CCL19 (20 nM) durante 15 minutos las lisamos para analizar por *Western Blot* la fosforilación de IKK α , empleando Abs específicos contra fosfo-IKK α (Ser176/180) y contra Pyk2 como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

Observamos que la activación de CCR7 tanto con CCL19 como con CCL21 produce un aumento en la fosforilación de IKK α en Ser176/180 (Figura 36A), residuos que necesitan estar fosforilados para que IKK α sea activa (Hacker et al. 2006). Además intentamos determinar si Akt1, cuya actividad es necesaria para que se degrade I κ B

(Sanchez-Sanchez et al. 2004), o GSK3 están implicadas en la vía de señalización que activa IKK α a través de CCR7. Para ello las CDs fueron tratadas con un inhibidor específico para Akt1 o con LiCl, para inhibir GSK3, posteriormente se estimularon con CCL19, se lisaron y analizamos el estado de fosforilación de IKK α mediante *Western Blot*. Observamos que CCL19 produce un aumento en la fosforilación de IKK α , y que este incremento en el estado de fosforilación no se encuentra inhibido en CDs tratadas con el inhibidor de Akt1 ni con LiCl (Figura 36B). No obstante no podemos descartar que realmente ni Akt1 ni GSK3 estén implicadas en la activación de IKK, ya que uno de los mecanismos por los que se ha descrito que GSK3 puede regular la actividad de IKK es compitiendo con las subunidades IKK α/β por la unión a IKK γ (Sanchez et al. 2003), que es la subunidad reguladora del complejo IKK. Mediante esta competición GSK3 es capaz de inhibir la actividad de IKK sin afectar al estado de fosforilación de IKK α/β . En resumen, no podemos descartar la existencia de otros mecanismos de regulación que no impliquen cambio en el estado de fosforilación de IKK α/β que es lo único que hemos analizado hasta el momento.

E.2 Los inhibidores de GSK3 producen un aumento en la expresión de Bcl-XL

Anteriormente demostramos que el aumento de p65 nuclear observado tras la estimulación con CCL19 o CCL21 se ve reflejado en un aumento en la transcripción de genes pro-supervivencia como Bcl-XL. Dado que la expresión de estos genes determina que NF- κ B sea un factor pro-supervivencia y puesto que se ha descrito que GSK3 puede regular la actividad de NF- κ B sobre promotores específicos (Steinbrecher et al. 2005; Ougolkov et al. 2007), decidimos comprobar si la inhibición de GSK3 afecta a la expresión de Bcl-XL y no sólo a la traslocación de p65. Para ello mantuvimos las CDs durante 10 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia o ausencia de los inhibidores de GSK3. Pasado este tiempo las células se lisaron y analizamos el nivel de expresión de Bcl-XL mediante *Western Blot*. Observamos que los tres inhibidores de GSK3 inducen un aumento significativo en la expresión de Bcl-XL (Figura 37), tal como se espera teniendo en cuenta que el tratamiento con estos agentes aumenta la localización de p65 en el núcleo y favorece la supervivencia de las CDs.

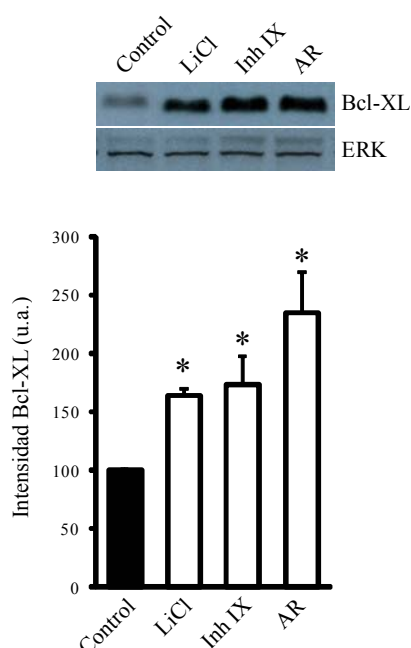


Figura 37. La inhibición de GSK3 produce un aumento en la expresión de Bcl-XL en CDs. Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 10 horas con tres inhibidores diferentes de GSK3, LiCl (20 mM), Inhibidor IX (4 μ M) o AR-A014418 (10 μ M), o bien sin tratamiento como control (Control). A continuación se lisaron y analizamos mediante *Western Blot* el nivel de Bcl-XL empleando Abs contra Bcl-XL y contra ERK2 total como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestra una gráfica que representa la variación en la expresión de Bcl-XL en CDs tratadas con cada uno de los inhibidores de GSK3 referida al nivel de expresión de Bcl-XL en las CDs control. Los valores se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir un modelo en el cual en condiciones pro-apoptóticas GSK3 β se encuentra activa impidiendo que p65 sea transportado al núcleo donde podría transcribir genes pro-supervivencia como Bcl-XL. En este modelo GSK3 β impide la traslocación de p65 estabilizando I κ B. Sin embargo, desconocemos el mecanismo concreto empleado por GSK3 en CDs para regular la estabilidad de I κ B (Figura 38). Una posibilidad es que esté inhibiendo la actividad del complejo IKK compitiendo con IKK α/β por la unión a IKK γ , mecanismo que ha sido descrito previamente en otros sistemas celulares (Sanchez et al. 2003). La presencia de factores pro-supervivencia como CCL19 o CCL21 induciría la activación de Akt1 y, por tanto, la inhibición de GSK3 β (Figura 38) que liberaría a IKK γ . Por tanto, la inhibición de GSK3 β contribuiría a la activación del complejo IKK inducida por CCR7. IKK fosforila I κ B induciendo su degradación y, como consecuencia, p65 queda libre para ser transportado al núcleo donde puede transcribir genes pro-supervivencia como Bcl-XL.

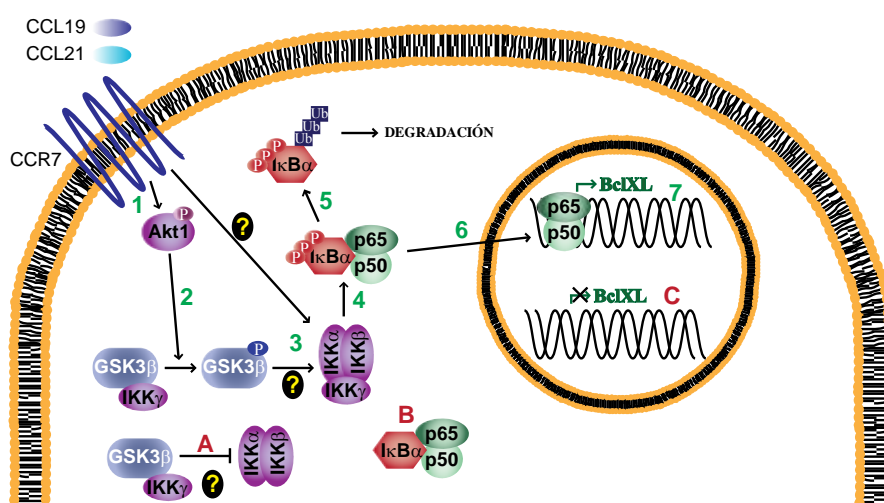


Figura 38. Modelo de regulación de la vía de NF- κ B ejercida por GSK3 β en CDs. En condiciones pro-apoptóticas GSK3 β puede estar inhibiendo una quinasa de I κ B, por ejemplo, IKK (A). Un posible mecanismo consiste en la interacción de GSK3 β con IKK γ , lo cual compite con IKK α/β por la unión a IKK γ y, por tanto, resulta en la inhibición del complejo IKK. De este modo I κ B se encuentra estabilizado y unido a NF- κ B impidiendo su traslocación al núcleo (B) y, con ello, la transcripción de genes pro-supervivencia como Bcl-XL (C). En presencia de un estímulo pro-supervivencia, CCL19 o CCL21, se produce la activación de Akt1 (1). Esta quinasa fosforila e inhibe GSK3 β (2), favoreciendo la activación del complejo IKK porque libera IKK γ (3). La activación de IKK permite que se fosforile (4) y se degrade I κ B (5), lo cual libera NF- κ B que puede ser transportado al núcleo de la célula (6) donde transcribe genes pro-supervivencia como Bcl-XL (7). Además la activación de Akt1 puede tener algún efecto directo sobre la activación del complejo IKK o sobre el propio I κ B, favoreciendo su degradación y activando NF- κ B.

F. GSK3 no regula β -catenina en CDs

β -catenina es una molécula implicada en múltiples procesos celulares como diferenciación celular, proliferación o supervivencia (Malbon 2005). β -catenina regula estas funciones porque actúa transactivando factores de transcripción, como TCF (T-cell factor) o FoxO, que regulan la expresión de genes implicados en estos procesos. Dada su importante función es necesario que la actividad de β -catenina esté estrechamente regulada, siendo GSK3 uno de los principales reguladores de la actividad de β -catenina. En condiciones basales GSK3 se encuentra activa y fosforila a β -catenina, lo cual permite que esta molécula sea ubiquitinada y degradada vía proteasoma. De esta forma el nivel de β -catenina se mantiene reducido y no puede transactivar otros factores de transcripción. Ante señales que conducen a la fosforilación e inhibición de GSK3 β -

catenina no es fosforilada y degradada, sino que aumenta su estabilidad. La acumulación de β -catenina conlleva a un aumento en el nivel de β -catenina en el núcleo, donde puede transactivar factores de transcripción como FoxO (Patel et al. 2004; Essers et al. 2005). Puesto que FoxO juega un papel importante en la supervivencia de las CDs (Riol-Blanco et al. 2009), β -catenina puede regular la actividad de FoxO y además GSK3 regula la actividad de β -catenina, decidimos testar si β -catenina es una de las moléculas mediadoras de los efectos pro-apoptóticos de GSK3 en las CDs.

Para determinar si GSK3 regula la actividad de β -catenina inhibimos GSK3 tratando las CDs con tres inhibidores diferentes o estimulando las células con CCL21 a distintos tiempos. Posteriormente analizamos el nivel de β -catenina mediante *Western Blot*. Observamos que ni la estimulación con CCL21 a los tiempos indicados ni el tratamiento con los inhibidores de GSK3 durante dos horas aumentó el nivel de β -catenina en las CDs (Figura 39A). Sin embargo, estos experimentos se realizaron en un plazo de tiempo demasiado corto para que las CDs entren en apoptosis y, por tanto, pensamos en la posibilidad de que β -catenina pudiera jugar un papel importante en condiciones apoptóticas. Por este motivo decidimos realizar experimentos de supervivencia celular manteniendo las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 24 horas para inducir apoptosis, en presencia de LiCl (para inhibir GSK3), de CCL19 (para determinar el papel de CCR7), o de FCS (como control de supervivencia), y analizamos el nivel de β -catenina mediante *Western Blot*. Los resultados muestran que en estas condiciones tampoco varía el nivel de β -catenina, ni siquiera en las CDs tratadas con LiCl (Figura 39B).

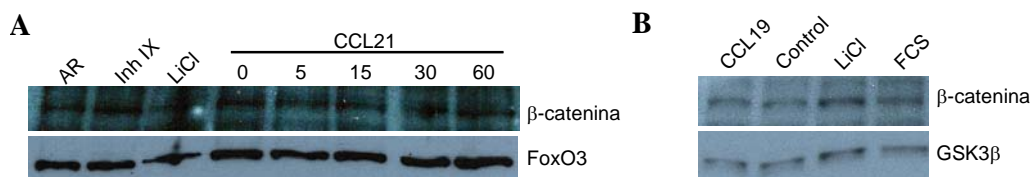


Figura 39. La inhibición de GSK3 en las CDs no afecta a la estabilidad de β -catenina. **A)** Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 1 hora con tres inhibidores diferentes de GSK3, LiCl (20 mM), Inhibidor IX (4 μ M) o AR-A014418 (10 μ M), o bien sin tratamiento como control. Además CDs que no habían sido tratadas fueron estimuladas con CCL21 (20 nM) durante los tiempos indicados. A continuación se lisaron y analizamos mediante *Western Blot* el nivel de β -catenina empleando Abs contra β -catenina y contra FoxO3 total como control de carga. **B)** Realizamos ensayos de apoptosis de CDs en presencia de CCL19 (20 nM), de LiCl (20 mM) para inhibir GSK3, de 10% FCS como control de supervivencia o bien de CDs sin tratamiento como control de apoptosis. Para inducir apoptosis las CDs se mantuvieron en RPMI 0,1% BSA con los tratamientos mencionados anteriormente durante 24 horas. A continuación se lisaron y analizamos mediante *Western Blot* el nivel de β -catenina empleando Abs contra β -catenina y contra GSK3 β total como control de carga. (Se muestra un experimento representativo de 3 realizados).

En su conjunto estos resultados indican que GSK3 no regula la actividad de β -catenina en las CDs maduras. El hecho de que la inhibición de GSK3 no resulte en un aumento en el nivel de β -catenina puede resultar sorprendente. Sin embargo, ya ha sido descrito en cultivos de células primarias o no transformadas, en los cuales deben existir otros mecanismos alternativos que permitan regular la actividad de β -catenina (Topol et al. 2003; Steinbrecher et al. 2005). Este resultado es considerablemente importante dado que se ha descrito que la acumulación de β -catenina inhibe la actividad de NF- κ B (Deng et al. 2002). De inducir la estimulación de CCR7 la acumulación de β -catenina, esto sugeriría que este receptor quimiotáctico debería inhibir la actividad de NF- κ B en lugar de activarla como demostramos anteriormente. Además β -catenina aumenta la actividad transcripcional de FoxO (Essers et al. 2005), que es una molécula pro-apoptótica en CDs.

RESULTADOS

En su conjunto el aumento de β -catenina debería tener un efecto pro-apoptótico en CDs ya que disminuiría la actividad de NF- κ B y aumentaría la actividad de FoxO. Por tanto, que ni CCR7 ni GSK3 regulen la actividad de β -catenina en CDs está en línea con los resultados mostrados anteriormente.

G. GSK3 β regula la actividad de FOXO en CDs

G.1 La actividad de GSK3 β regula la localización de FOXO1/3 en CDs

FoxO es un factor de transcripción pro-apoptótico en las CDs y su actividad puede ser regulada por CCR7. Puesto que GSK3, que también es una molécula pro-apoptótica, es regulada por CCR7 y no existe información previa en la bibliografía acerca de si GSK3 puede regular factores de transcripción de la familia de FoxO, analizamos si GSK3 pudiera regular la actividad de FoxO. Uno de los principales mecanismos de control de la actividad de FoxO consiste en la regulación de su localización. Como se mencionó anteriormente, en condiciones apoptóticas FoxO localiza en el núcleo donde puede transcribir genes pro-apoptóticos como Bim. En presencia de un estímulo de supervivencia FoxO es excluido del núcleo y mantenido en el citoplasma mediante su asociación con las proteínas 14-3-3 (Figura 7) (Brunet et al. 1999; Brunet et al. 2002). Puesto que la localización es un mecanismo básico de regulación de estos factores de transcripción decidimos analizar si la inhibición de GSK3 altera la localización de FoxO. Para este fin nucleofectamos las CDs con una construcción que codifica para el factor de transcripción FoxO1 fusionado a GFP (FoxO1-GFP), lo cual nos permite determinar la localización de FoxO1 observando simplemente si la GFP se encuentra concentrada en el núcleo celular o si se encuentra localizada principalmente en el citoplasma (Figura 40). Empleamos CDs nucleofectadas con el plásmido pGFP como control, y observamos que la localización de GFP es principalmente citoplasmática. Para determinar el efecto de GSK3 sobre la localización de FoxO1 las CDs nucleofectadas con pGFP o FoxO1-GFP se mantuvieron 6 horas en RPMI 0,1% BSA para inducir apoptosis, en presencia de LiCl (para evaluar el papel de GSK3) o de NaCl (como control). Además empleamos CDs mantenidas RPMI 10% FCS como control de supervivencia celular. Los resultados muestran que la localización del plásmido control, pGFP, no se encuentra alterada con los distintos tratamientos empleados. Sin embargo observamos que la presencia de FCS disminuye el porcentaje de CDs que presentan una localización nuclear de FoxO1-GFP con respecto a las CDs control (Figura 40), lo cual es un buen control dado que el suero contiene factores pro-supervivencia que inhiben factores de transcripción de la familia FoxO. El tratamiento con LiCl tiene un efecto similar al del suero, reduciendo la localización nuclear de FoxO1. Estos resultados están en línea con el concepto de que la inhibición de GSK3 aumenta la supervivencia celular, puesto que este efecto sobre la localización de FoxO1 produciría una inhibición en la actividad pro-apoptótica de estos factores de transcripción.

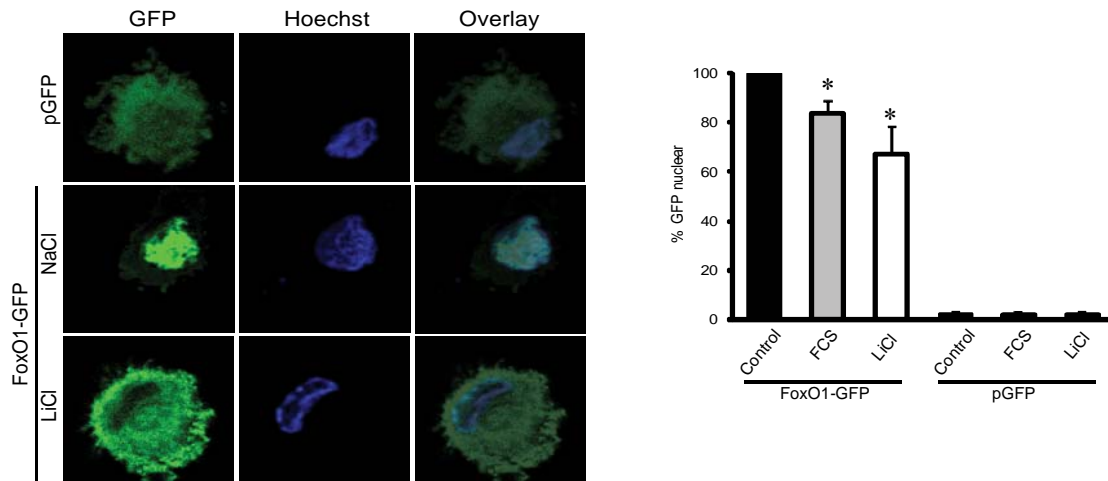


Figura 40. La inhibición de GSK3 aumenta la traslocación al citoplasma de FoxO1-GFP. Las CDs fueron nucleofectadas con pGFP o FoxO1-GFP, 15-18 horas después de la transfección recogimos las células y las mantuvimos 3 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia de NaCl (Control) o de LiCl, para inhibir GSK3 (ambos a 20 mM). Además empleamos CDs mantenidas en RPMI 10% FCS como control de supervivencia. Pasado el tiempo indicado a las CDs se les permitió adherirse sobre cubreobjetos recubiertos con PLL. Posteriormente, se procesaron para inmunofluorescencia realizando la tinción con Hoechst 33342 para poder identificar el núcleo celular y determinar la localización nuclear o citoplasmática de GFP. A la izquierda se muestran imágenes representativas de CDs tratadas con NaCl o LiCl y a la derecha una gráfica que representa el porcentaje de CDs que presentan GFP localizada en el núcleo referido al porcentaje obtenido en las CDs control. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

Para confirmar que GSK3 regula la traslocación al citoplasma de FoxO1 mantuvimos las CDs durante 6 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia de LiCl, de NaCl o de 10% FCS, usado como control de supervivencia. Pasado este tiempo separamos las fracciones proteicas de núcleo y citoplasma y analizamos el nivel de FoxO1 en ambas fracciones mediante *Western Blot*. Los resultados muestran una reducción clara en el nivel de FoxO1 en núcleo tanto en CDs tratadas con 10% FCS como con LiCl cuando son comparadas con las CDs de control, que fueron tratadas con NaCl (Figura 41). La densitometría de los experimentos realizados muestra una reducción media de un 30-40% en el nivel de FoxO1 nuclear en CDs tratadas con LiCl con respecto a las que fueron tratadas con NaCl (Figura 41).

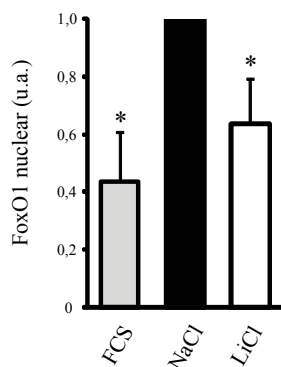
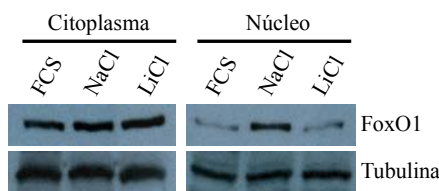


Figura 41. La inhibición de GSK3 reduce la traslocación al núcleo de FoxO1 en condiciones pro-apoptóticas. Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 5-6 horas para inducir condiciones apoptóticas en las cuales FoxO se encuentre en el núcleo, ya sea en presencia de NaCl (Control), LiCl para inhibir GSK3 (ambos a 20 mM) o bien en presencia de 10% FCS como control de supervivencia. Pasado este tiempo seguimos el protocolo de fraccionamiento nuclear (ver *Materiales y Métodos*) y analizamos mediante *Western Blot* la localización de FoxO1 en la fracción nuclear y citoplasmática de CDs con los diferentes tratamientos descritos. Para ello empleamos Abs contra FoxO1 y contra α -Tubulina como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestran las gráficas que representan la variación en la localización nuclear de FoxO1 producida por los tratamientos con LiCl o con FCS, los valores mostrados se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos y, en todos los casos, se encuentran referidos al nivel de FoxO1 nuclear en las CDs mantenidas con NaCl. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

RESULTADOS

Puesto que anteriormente demostramos que la principal isoforma de GSK3 que regula la supervivencia de las CDs es GSK3 β y dado que el LiCl inhibe tanto GSK3 α como GSK3 β , decidimos nucleofectar las CDs con la construcción de GSK3 β -CA y analizar su efecto sobre la localización de FoxO para determinar si, en efecto, es GSK3 β la isoforma implicada en la regulación de estos factores de transcripción. Además en estos experimentos analizamos el efecto que ejerce la forma activa de GSK3 β sobre FoxO1 y FoxO3 con el objetivo de clarificar si GSK3 β regula específicamente a FoxO1 o puede afectar a la localización de otros miembros de la familia FoxO, como FoxO3. Los resultados muestran que la expresión de GSK3 β -CA produce un aumento significativo en el nivel nuclear tanto de FoxO1 como de FoxO3 (Figura 42A y B). La densitometría de los experimentos realizados indica que el nivel nuclear tanto de FoxO1 como de FoxO3 aumenta aproximadamente 1,5 veces en las CDs que expresan GSK3 β -CA con respecto a las CDs que fueron nucleofectadas con pcDNA. Estos resultados confirman que la inhibición de GSK3 reduce el nivel de FoxO1 nuclear y que es GSK3 β la isoforma implicada en regular la localización de FoxO1. Además demuestran que GSK3 β regula la localización tanto de FoxO1 como de FoxO3.

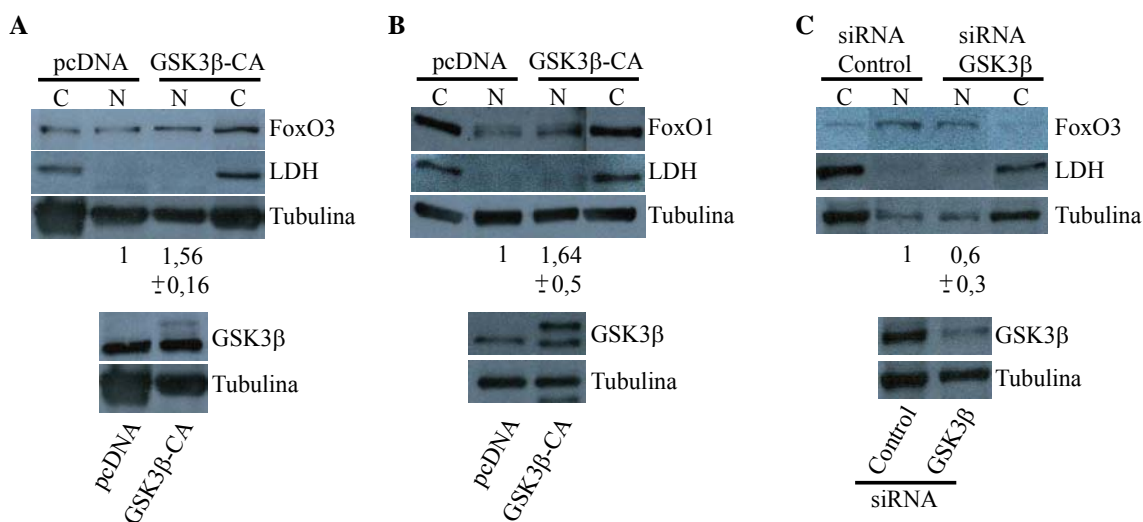


Figura 42. GSK3 β es la isoforma implicada en regular la localización tanto de FoxO1 como de FoxO3 en CDs.

A) Las CDs fueron nucleofectadas con pcDNA o con GSK3 β -CA. 14-16 horas después de la transfección seguimos el protocolo de fraccionamiento nuclear (ver *Materiales y Métodos*) y analizamos mediante *Western Blot* la localización de FoxO3 en la fracción nuclear y citoplasmática de las CDs nucleofectadas. Para ello empleamos Abs contra FoxO3 total, contra LDH como control del fraccionamiento y contra α -Tubulina como control de carga. La expresión de GSK3 β -CA se confirmó realizando un *Western Blot* con Abs contra GSK3 β total y contra α -Tubulina como control de carga (parte inferior de la figura). **B)** Las CDs se nucleofectaron con pcDNA o con GSK3 β -CA. 14-16 horas después de la transfección seguimos el protocolo de fraccionamiento nuclear y analizamos mediante *Western Blot* la localización de FoxO1 en la fracción nuclear y citoplasmática de las CDs nucleofectadas empleando Abs contra FoxO1 total, contra LDH y contra α -Tubulina. La expresión de GSK3 β -CA se confirmó realizando un *Western Blot* con Abs contra GSK3 β total y contra α -Tubulina (parte inferior de la figura). **C)** Las CDs fueron nucleofectadas con un siRNA específico para reducir la expresión de GSK3 β o con un siRNA control. 36-48 horas después de la transfección recogimos las CDs y las mantuvimos en RPMI 0,1% BSA durante 6 horas, tras lo cual seguimos el protocolo de fraccionamiento nuclear (ver *Materiales y Métodos*) para analizar mediante *Western Blot* la localización de FoxO3 en la fracción nuclear y citoplasmática de las CDs nucleofectadas. Empleamos Abs contra FoxO3 total, contra LDH como control del fraccionamiento y contra α -Tubulina como control de carga. La reducción en la expresión de GSK3 β se confirmó realizando un *Western Blot* con Abs contra GSK3 β total y contra α -Tubulina como control de carga (parte inferior de la figura). (Se muestran experimentos representativos de 3 realizados para cada apartado de la figura).

También quisimos validar el efecto de GSK3 β sobre FoxO3 empleando un siRNA específico para reducir la expresión de GSK3 β y realizando a continuación un fraccionamiento subcelular para ver la localización de FoxO3. Comprobamos que, al igual que ocurría con el LiCl, la reducción de la expresión de GSK3 β produjo una reducción significativa en la localización nuclear de FoxO, en este caso de FoxO3 (Figura 42C). La densitometría de los experimentos realizados con siRNA para GSK3 β muestra una reducción media de un 40% en el nivel de FoxO3 nuclear, un porcentaje similar al obtenido con LiCl para FoxO1 y que, por tanto, corrobora el concepto de que la isoforma de GSK3 implicada en la regulación de la localización de FoxO es GSK3 β .

En resumen, los resultados anteriores muestran que GSK3 β puede regular la localización de factores de transcripción de la familia FoxO. Esta regulación se produce de modo que cuando GSK3 β se encuentra activa contribuye a incrementar la localización de FoxO en el núcleo, donde actúa como un factor de transcripción pro-apoptótico. Por el contrario, si se bloquea GSK3 β se facilita la traslocación de FoxO al citoplasma, donde se mantendrá inhibido.

G.2 La inhibición de GSK3 produce una disminución en la expresión de Bim

Los resultados anteriores muestran que la inhibición de GSK3 contribuye a reducir el nivel de FoxO nuclear. Uno de los mecanismos por los cuales los inhibidores de GSK3 aumentan la supervivencia puede consistir en bloquear la actividad transcripcional de FoxO y, como consecuencia, reducir la expresión de genes pro-apoptóticos como Bim. Para testar esta posibilidad en las CDs, mantuvimos las células durante 10 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia o ausencia de tres inhibidores diferentes de GSK3. Pasado este tiempo las células se lisaron y analizamos el nivel de expresión de Bim mediante *Western Blot*. Observamos que el tratamiento con todos los inhibidores de GSK3 empleados produce una disminución significativa en la expresión de Bim (Figura 43), acorde con el efecto que estos compuestos ejercen reduciendo la localización nuclear de FoxO y favoreciendo la supervivencia de las CDs. La densitometría de los experimentos realizados indica que la disminución en la expresión de Bim obtenida con los tres inhibidores es muy similar, siendo la reducción media de un 30-40% respecto al control.

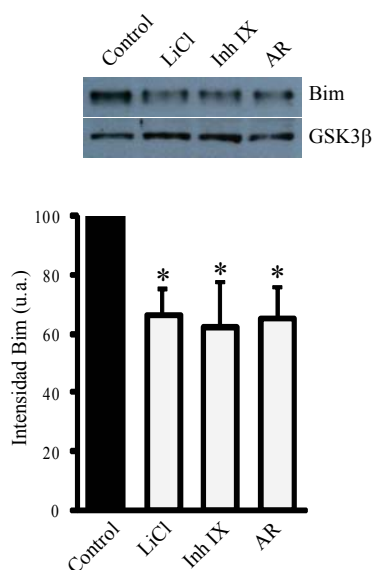


Figura 43. La inhibición de GSK3 produce una disminución en la expresión de Bim en CDs. Mantuvimos las CDs en RPMI 0,1% BSA durante 10 horas con tres inhibidores diferentes de GSK3, LiCl (20 mM), Inhibidor IX (4 μ M) o AR-A014418 (10 μ M), o bien sin tratamiento como control (Control). A continuación se lisaron y analizamos mediante *Western Blot* el nivel de Bim empleando Abs contra Bim y contra GSK3 β total como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestra una gráfica que representa la variación en la expresión de Bim en CDs tratadas con cada uno los inhibidores de GSK3 referida al nivel de expresión de Bim en las CDs control. Los valores se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * p <0,05).

RESULTADOS

G.3 GSK3 β y FOXO3 interactúan en CDs

Hasta el momento hemos demostrado que la inhibición de GSK3 disminuye la localización nuclear de FoxO y que este efecto se refleja en una menor actividad transcripcional que tiene como consecuencia la reducción en la expresión de genes pro-apoptóticos regulados por FoxO, como Bim. Sin embargo, desconocemos los mecanismos por los cuales GSK3 regula la localización de FoxO. Puesto que no existe mucha información previa en la literatura, decidimos analizar las secuencias tanto de FoxO1 como de FoxO3 para identificar potenciales dianas de fosforilación de GSK3. Esta quinasa fosforila residuos de Serina o Treonina separados por tres aminoácidos cualquiera, es decir, S/TxxxS/T, donde x representa cualquier aminoácido. Además la actividad de GSK3 sobre sus sustratos es mayor cuando éstos se encuentran “primados”, es decir, cuando el primer residuo de S/T ha sido previamente fosforilado por otra quinasa, siendo la secuencia por la que GSK3 tiene mayor afinidad pS/TxxxS/T. Este cambio en la afinidad por sus sustratos según hayan sido o no primados proporciona un mecanismo de regulación adicional de la actividad de GSK3 (Jope et al. 2004). Al analizar la secuencia de FoxO1 y FoxO3 hallamos que ambas moléculas presentan varias dianas potencialmente fosforilables por GSK3 (residuos de Ser o Thr marcados en rojo en la Figura 44), lo cual ofrece la posibilidad de que FoxO sea un sustrato de GSK3.

FoxO3A

```
MAEAPASPAP LSPLEVELDP EFEPQSRP RS CTWELQRP EL QASPAKPSGE TAAD SM IPEE
EDDEDEDGG GRAGSAMAIG GGGSGTLGS GLLLEDSARV LAPGGQDPGS GPATAAGGLS
GGTQALLQPQ QPLPPPQPGA AGGGGQPRKC SRRRRAWGNL SYADLITRAI ESSPDKRLTL
SQIYEWVRC VPFYFKDKGDS NSSAGWKNSI RHNLSLHSRF MRVQNEGTGK S SW IINPDG
GKSGKAPRRR AVSMDN SN KY TK SRGRAAK KAALQTAPE S ADDSPQLSK WPGSPTRS S
DELDAWTDFR S RTNS NA STV SG RLSPIMAS TELDEVQDDD AFLSPMLYSS SA SL SPVSK
PCTVELPRLT DMAGTMNLND GLTENLMDL LDNITLPP SQ PSPTGGLMQ R SS SPPV TK G
SGL SPTS SF NSTVFGPSSL NS LRQSPMQT IQENKPATFS SMSHYGNQTL QDLLTSDSL S
HSDVMMTQSD PLMSQAS TAV SAQNSRRNVM LRNDPMSFA AQPNOGSLVN QNLLHHQHT
QGALGGSRAL S NSVSNMGLS ESS SL GSAKH QQQSPVQSM QTLSD SL SGS S LYS TS ANLP
VMGHEKFPSP LDLMFNGSL ECDMESIIR S ELMDADGLDF NFDLSLIS TQ N VVGLNVGNFT
GAKQASSQSW VPG
```

FoxO1A

```
MAEAPQVVEI DPDFEPLPRP RS CTWELPRP EFSQSN SATS SPAPSGSAAA NPDAAGLPS
ASAAAVSADF MSNLSLLEES EDFPQAPGSV AA AVAAAAA AATGGLCGDF QGPEAGCLHP
APPQPPPPGP LSQHPPVPPA AAGPLAGQPR KSSSSRRNAW GNLSYADLIT KAIESSAEKR
LTL SQIYEWV VKSVYFKDK GDSNSSAGWK NSIRHNLSLH SKFIRVQNEG TGKS SW WMLN
PEGKSGKSP RRAASMDNN SKFAKSRRA AKKKASLQSG QEGAGD SPGS QFSKWPASPG
SHSNDDFRNW STFRPRTSSN A ST ISGR SP IMTEQDDLGE GDVHSMVYPP SAAKMASTLP
SL SEISNPEN MENLLDNLNL LSSPT SL TVS TQ SPGTMMQ QTPCY SF APP NT SLN SP SPN
YQKYTYQ QS MSPLPQMPIQ TLQDNKSSYG GMSQYNCAPG LLKELLTSDS PPHNDIMTPV
DPGVAQPNSR VLGQNVMMGP NSVMS TY GSQ ASHNKMMNPS SHTHPGHAQQ TSAVNGRPLP
HTVSTMPH TS GMRNLTQVK T PVQVPLPHM QMSALGGYSS VS SC NGYGRM GLLHQEKLP
LLDGMFIERL DCDMESIIRN DLMDGDTLDF NFDNVLPNQS FPH SV KT TH SWVSG
```

GSK3: S/TxxxP/T

14-3-3: RSxpS/TxP RxxxP/TxP

Figura 44. Secuencia de FoxO1 y de FoxO3 mostrando posibles dianas para GSK3 (representadas en color rojo) y las secuencias reconocidas por las proteínas 14-3-3 (marcadas por un rectángulo en color azul). La zona sombreada delimita el dominio de interacción con el DNA.

En el caso de FoxO1 una de las dianas para GSK3 se encuentra a continuación de un sitio que es fosforilado por la quinasa DYRK1A. Rena y colaboradores demostraron que *in vitro* DYRK1A fosforila FoxO1 generando un sustrato primado que es fosforilado por GSK3 β (Rena et al. 2002). Anteriormente mostramos que GSK3 puede regular la localización de FoxO y con ello su actividad transcripcional, pero el mecanismo de regulación empleado por GSK3 es desconocido. Realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación para determinar si GSK3 β y FoxO interactúan en CDs en un contexto pro-apoptótico, lo cual unido al hecho de que GSK3 puede fosforilar FoxO *in vitro* (Rena et al. 2002) podría indicar la existencia de un mecanismo de regulación directa de FoxO por GSK3 β .

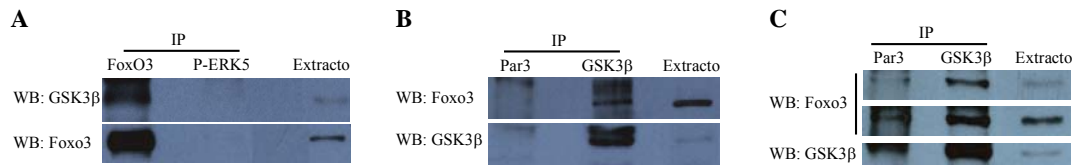


Figura 45. GSK3 β y FoxO3 interactúan en CDs y en células Jurkat. **A)** Las CDs se mantuvieron 6 horas en RPMI 0,1% BSA, que son condiciones pro-apoptóticas. Posteriormente inmunoprecipitamos con Abs específicos contra FoxO3 total y contra fosfo-ERK5, ya que previamente observamos que esta fosforilación no se produce en estas condiciones y, por tanto, decidimos emplearlo como Ab control en la inmunoprecipitación. A continuación analizamos si GSK3 β interacciona con FoxO3 realizando un *Western Blot* del inmunoprecipitado empleando Abs contra FoxO3, para verificar que se inmunoprecipitó, y contra GSK3 β , para determinar si se encuentra presente en el inmunoprecipitado. **B)** Las CDs se mantuvieron 6 horas en RPMI 0,1% BSA, que son condiciones pro-apoptóticas. Posteriormente inmunoprecipitamos con Abs específicos contra GSK3 β total y contra Par3 (como Ab control en la inmunoprecipitación). A continuación analizamos si GSK3 β y FoxO3 interactúan realizando un *Western Blot* del inmunoprecipitado empleando Abs contra GSK3 β , para verificar que se inmunoprecipitó, y contra FoxO3, para determinar si se encuentra presente en el inmunoprecipitado. **C)** Empleamos cultivos de células Jurkat para inmunoprecipitar GSK3 β . Para ello mantuvimos las células 6 horas en RPMI 0,1% BSA y posteriormente inmunoprecipitamos con Abs contra GSK3 β y contra Par3 (como Ab control en la inmunoprecipitación). A continuación analizamos si GSK3 β interacciona con FoxO3 realizando un *Western Blot* del inmunoprecipitado empleando Abs contra GSK3 β , para verificar que se inmunoprecipitó, y contra FoxO3, para determinar si se encuentra presente en el inmunoprecipitado. (Se muestra un experimento representativo de 2 realizados en cada apartado).

Con el objetivo de determinar si GSK3 β interacciona con FoxO en las CDs, mantuvimos las células 6 horas en RPMI 0,1% BSA para inducir unas condiciones pro-apoptóticas en las cuales GSK3 β se encuentra activa y, pasado este tiempo, realizamos extractos proteicos de las CDs. A continuación inmunoprecipitamos GSK3 β y analizamos la presencia de FoxO3 en el inmunoprecipitado (Figura 45B), o a la inversa, inmunoprecipitamos FoxO3 y analizamos la presencia en el inmunoprecipitado de GSK3 β (Figura 45A). Los resultados obtenidos en estas inmunoprecipitaciones demuestran claramente que FoxO3 y GSK3 β interactúan en las CDs (Figura 45A y B). Cabe señalar que los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron inicialmente en cultivos de células Jurkat, en las cuales también encontramos FoxO3 al inmunoprecipitar GSK3 β (Figura 45C). Estos resultados demuestran que la interacción entre GSK3 β y FoxO3 ocurre también en células Jurkat, lo cual indica que GSK3 β podría regular la actividad de FoxO3 en otros tipos celulares y no exclusivamente en las CDs.

Los resultados obtenidos demuestran que GSK3 β interacciona con FoxO3 en condiciones en las cuales GSK3 β se encuentra activa (Figura 45). Además existen dianas de fosforilación de GSK3 β en la secuencia de FoxO, algunas de las cuales podrían afectar a la asociación con las proteínas 14-3-3 (Figura 44), y se ha descrito que GSK3 β fosforila FoxO1 *in vitro* (Rena et al. 2002). También hemos demostrado que una mayor actividad de GSK3 β incrementa el nivel de FoxO1/3 nuclear y que, por el contrario, la inhibición de GSK3 β conlleva a una reducción en el nivel de FoxO1/3 nuclear (Figura 40, 41 y 42). Estos datos nos permiten proponer un modelo en el cual en condiciones pro-apoptóticas GSK3 β activa podría fosforilar directamente a FoxO1/3 alterando su asociación con las proteínas 14-3-3 y promoviendo su traslocación al núcleo (Figura 46).

RESULTADOS

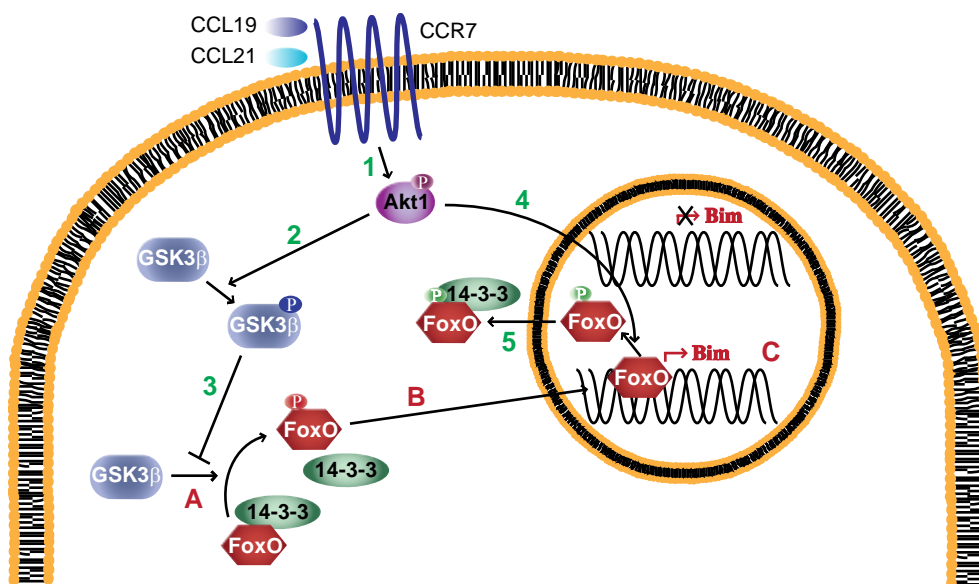


Figura 46. Modelo de regulación de la actividad de FoxO por GSK3 β en CD4⁺ Tregs. En condiciones pro-apoptóticas GSK3 β se encuentra activa y, potencialmente, podría fosforilar FoxO (A) alterando la interacción de estos factores de transcripción con las proteínas 14-3-3, que son las responsables de mantenerlos en el citosol inhibidos. Si esto es así y se rompe la interacción de FoxO con las 14-3-3 (B), éste quedaría libre para transportarse al núcleo donde puede transcribir genes pro-apoptóticos como Bim (C). En presencia de un estímulo pro-supervivencia como CCL19 o CCL21 se produce la activación de Akt1 (1). Esta quinasa fosforila e inhibe GSK3 β (2), lo cual implica que al estar inhibida GSK3 β no puede fosforilar a FoxO y activarlo facilitando su transporte al núcleo (3). Además Akt1 activa fosforila directamente a FoxO (4) creando sitios de interacción con las proteínas 14-3-3 y, como consecuencia, inhibiéndolo porque induce su traslocación al citosol (5).

H. GSK3 β activa antagoniza el efecto pro-supervivencia de Akt1 y su inhibición es necesaria para la inducción de supervivencia por CCR7

Dado que la actividad de GSK3 β tiene efectos contrarios a la de Akt1 sobre la localización de NF- κ B y FoxO, nos preguntamos si Akt1 necesita inhibir GSK3 β para ejercer completamente su función pro-supervivencia, evitando así que esta quinasa contrarreste su efecto anti-apoptótico. Para comprobar si esta hipótesis es cierta empleamos la construcción de GSK3 β -CA, lo cual permite que cuando se active Akt1 esta forma mutada de GSK3 β no sea inhibida. Como lectura del efecto sobre la actividad de NF- κ B y FoxO empleamos la expresión de Bcl-XL y Bim, respectivamente. El experimento realizado consiste en mantener CD4⁺ Tregs nucleofectadas con el vector control, pcDNA, o con la forma constitutivamente activa de GSK3 β , 10 horas en RPMI 0,1% BSA en presencia o ausencia de los ligandos de CCR7. Pasado este tiempo lisamos las CD4⁺ Tregs y analizamos el nivel de expresión de Bcl-XL y de Bim, como medida indirecta de la actividad transcripcional de NF- κ B y FoxO.

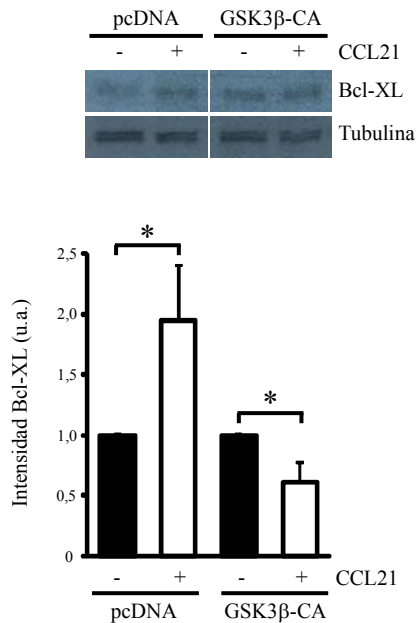


Figura 47. La actividad de GSK3β contrarresta el efecto pro-supervivencia que Akt1 ejerce en CDs activando la vía de NF-κB. Las CDs fueron nucleofectadas con pcDNA o con GSK3β-CA. 5 horas después de la transfección recogimos las CDs y las mantuvimos en RPMI 0,1% BSA durante 5 horas más, ya sea en presencia o ausencia de CCL21 (20 nM). Pasado este tiempo lisamos las CDs y analizamos mediante *Western Blot* la expresión de Bcl-XL empleando Abs contra Bcl-XL y contra α-Tubulina como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestra una gráfica que representa la variación en la expresión de Bcl-XL inducida por CCL21. Los valores mostrados se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos y se presentan referidos al nivel de expresión de Bcl-XL en las CDs no estimuladas con CCL21. (La gráfica representa la media ± SEM de 3 experimentos realizados, *p<0,05).

En primer lugar analizamos el efecto sobre la expresión de Bcl-XL. Como se observa en la [Figura 47](#), en presencia de CCL21 aumenta significativamente la expresión de Bcl-XL en CDs nucleofectadas con el vector control, confirmando los resultados presentados anteriormente ([Figura 31](#)). Este incremento es posible porque el tratamiento con la quimioquina activa Akt1, lo cual aumenta la actividad transcripcional de NF-κB por un lado y, por otro, inhibe GSK3β facilitando aún más la traslocación al núcleo de NF-κB. Si nuestra hipótesis es cierta y la actividad de GSK3β contrarresta el efecto de Akt1, la expresión de GSK3β-CA debería disminuir el aumento en la expresión de Bcl-XL inducido por CCL21. De hecho los resultados muestran que no sólo se reduce el incremento en la expresión de Bcl-XL inducido por CCL21, sino que este efecto se abroga por completo ([Figura 47](#)). Esto es así porque a pesar de que la activación de Akt1 puede aumentar la actividad transcripcional de NF-κB, como las células están expresando GSK3β-CA Akt1 no puede inhibir la actividad de GSK3β, de forma que esta quinasa está dificultando la traslocación de p65 al núcleo y, por tanto, disminuyendo la capacidad de Akt1 para incrementar la expresión de Bcl-XL.

Finalmente, analizamos si la expresión de GSK3β-CA afecta también a la capacidad de CCL21 para regular la actividad transcripcional de FoxO y, por tanto, la expresión de Bim. Observamos que en las CDs nucleofectadas con pcDNA el tratamiento con CCL21 produce una reducción significativa en la expresión de Bim, como ya mostramos anteriormente ([Figura 32](#)). Además la expresión de GSK3β-CA inhibe el efecto de CCL21 sobre la expresión de Bim ([Figura 48](#)), lo cual corrobora la hipótesis planteada anteriormente también para FoxO. Esto es, la estimulación con CCL21 activa Akt1 que, por un lado inhibe a FoxO directamente y, por otro, inhibe GSK3β que, de lo contrario estaría contribuyendo a aumentar la localización de FoxO en el núcleo y, por tanto, aumentaría su actividad transcripcional contrarrestando el efecto pro-supervivencia de Akt1.

RESULTADOS

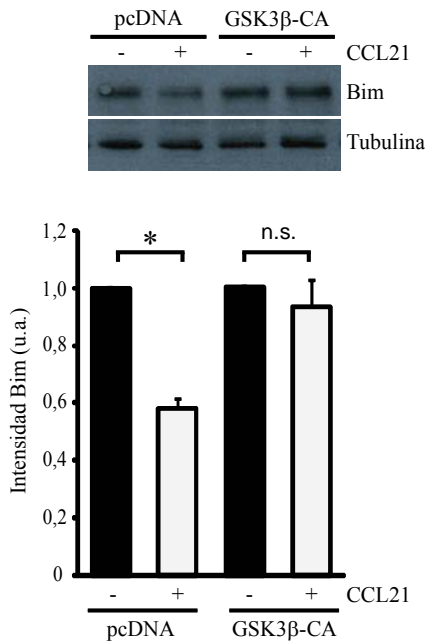


Figura 48. La actividad de GSK3 β contrarresta el efecto pro-supervivencia que Akt1 ejerce en CDs inhibiendo la actividad de FoxO. Las CDs fueron nucleofectadas con pcDNA o con GSK3 β -CA. 5 horas después de la transfección recogimos las CDs y las mantuvimos en RPMI 0,1% BSA durante 5 horas más, ya sea en presencia o ausencia de CCL21 (20 nM). Pasado este tiempo lisamos las CDs y analizamos mediante *Western Blot* la expresión de Bim empleando Abs contra Bim y contra α -Tubulina como control de carga. En la parte superior se muestra un experimento representativo de 3 realizados. En la parte inferior se muestra una gráfica que representa la variación en la expresión de Bim inducida por CCL21. Los valores mostrados se obtuvieron densitometrando los *blots* de varios experimentos y se presentan referidos al nivel de expresión de Bim en las CDs no estimuladas con CCL21. (La gráfica representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados, * $p < 0,05$).

Estos resultados demuestran que es necesario que se produzca la inhibición de GSK3 β , ya que de lo contrario el pool de GSK3 β que permaneciese activo contribuiría a aumentar la actividad de FoxO y a reducir la de NF- κ B contrarrestando el efecto pro-supervivencia de Akt1.

DISCUSIÓN

Las CD_s son las CPAs profesionales del sistema inmune y, por tanto, su función es esencial en el organismo. Además múltiples estudios relacionan la importancia de mantener la longevidad de las CD_s dentro de unos márgenes determinados. En este sentido se ha observado que si su vida media disminuye se producen defectos en la respuesta inmune (Jung et al. 2002; Hou et al. 2004) y si aumenta pueden desarrollarse síntomas de autoinmunidad debido a una activación exacerbada de los linfocitos (Chen et al. 2006; Chen et al. 2007b). A pesar de su importancia no existe mucha información sobre los mecanismos moleculares implicados en regular la supervivencia de las CD_s, aunque sí se sabe que tanto miembros pro- como anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 son importantes en este proceso (Hou et al. 2004; Chen et al. 2007a), que factores de transcripción de la familia FoxO son moléculas pro-apoptóticas (Riol-Blanco et al. 2009) y que la activación de CCR7 induce un aumento en la supervivencia de las CD_s a través de una vía que activa proteínas G heterotriméricas de la familia $\alpha_{i/0}$, PI3K, Akt1 y NF- κ B (Sanchez-Sanchez et al. 2004).

GSK3 es una quinasa implicada en la regulación de la apoptosis, aunque ha sido descrita como pro- o anti-apoptótica dependiendo del tipo celular y del estímulo de muerte empleado (Hetman et al. 2000; Hoeflich et al. 2000; Ougolkov et al. 2005; Beurel et al. 2006; Eom et al. 2007). Esto hace que su función deba ser estudiada en los tipos celulares de interés. Por tanto, nuestro primer objetivo consistió en estudiar el papel que tiene esta quinasa en la supervivencia de las CD_s.

En este trabajo empleamos un modelo de inducción de apoptosis en las CD_s mediante la privación de factores de crecimiento para estudiar el papel de la quinasa GSK3 en la supervivencia de las CD_s. Mediante el uso de inhibidores de GSK3 demostramos que esta quinasa es una molécula pro-apoptótica en las CD_s humanas derivadas de monocitos (Figura 8) y CD_s esplénicas murinas *in vitro* (Figura 13). Este efecto pro-apoptótico es tan marcado que los inhibidores de GSK3 aumentan la supervivencia de las CD_s incluso en condiciones no apoptóticas (Figura 10). Asimismo demostramos la relevancia de esta función *in vivo*, puesto que el tratamiento con un inhibidor de GSK3 también produce un aumento de la supervivencia de las CD_s en los ganglios linfáticos (Figura 15), remarcando el carácter pro-apoptótico de GSK3. Existen dos isoformas de GSK3, GSK3 α y GSK3 β . El hecho de que el fenotipo de los *knockout* de cada una de ellas sea diferente (Hoeflich et al. 2000; MacAulay et al. 2007), indica que no existe redundancia funcional entre ambas, sino que cada una cumple funciones específicas. Dado que los inhibidores farmacológicos que hemos empleado actúan sobre ambas isoformas, empleamos siRNAs específicos para GSK3 α y GSK3 β con el objetivo de determinar la participación de cada isoforma en la supervivencia de las CD_s. Observamos que la reducción de GSK3 β reducía significativamente la apoptosis de las CD_s. Sin embargo, la reducción de la expresión de GSK3 α no produce una disminución significativa en la apoptosis de las CD_s, demostrando que GSK3 β es la principal isoforma implicada en regular la supervivencia de estas células (Figura 11). Para confirmar este resultado empleamos una forma mutada de GSK3 β que no responde a inhibición por fosforilación (GSK3 β -CA). La expresión de esta construcción produjo un

DISCUSIÓN

aumento en la apoptosis de las CD_s (Figura 12), confirmando el efecto pro-apoptótico de GSK3 β .

Estas observaciones son relevantes ya que, como mencionamos anteriormente, la longevidad de las CD_s afecta a la capacidad de respuesta del sistema inmune. Por tanto, si la actividad de GSK3 β aumenta las CD_s vivirán menos tiempo y esto podría producir defectos en la respuesta inmunológica. Por el contrario, la inhibición de GSK3 β puede producir un aumento excesivo en la supervivencia de las CD_s y podría conducir a la aparición de síntomas de autoinmunidad. Por tanto, GSK3 β es una diana potencial que podría ser empleada para modular la respuesta inmune. En este sentido, los resultados de este trabajo sugieren que el tratamiento con LiCl, que se emplea para el tratamiento de trastornos bipolares, pudiera tener efectos secundarios sobre la respuesta inmunológica. Aunque se requiere un trabajo más exhaustivo para confirmar el efecto de la inhibición de GSK3 *in vivo* y cómo puede esto afectar al sistema inmune.

CCR7 es un receptor de quimioquinas esencial para mantener la estructura de los órganos linfoides secundarios y para dirigir la migración de las CD_s a los ganglios linfáticos como demuestra el fenotipo de ratones *knockout* de CCR7 (Forster et al. 1999) y de los ratones *plt/plt*, que son deficientes en los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21 (Gunn et al. 1999). Además, este receptor es capaz de regular en las CD_s otras funciones aparte de la quimiotaxis, como son la velocidad migratoria, la endocitosis, la maduración o la supervivencia (Sanchez-Sanchez et al. 2006). Se ha descrito que la estimulación de las CD_s con CCL19 o CCL21 induce un aumento en la supervivencia de las CD_s a través de una vía que activa proteínas G heterotriméricas de la familia $\alpha_{i/0}$, PI3K, Akt1 y NF- κ B (Sanchez-Sanchez et al. 2004). Puesto que GSK3 β es una molécula pro-apoptótica, analizamos el efecto que tiene la activación de CCR7 sobre la actividad de GSK3 β , demostrando que la estimulación con CCL19 y CCL21 induce la fosforilación de GSK3 β en el residuo de serina9 (Figura 16), fosforilación que inhibe la actividad de GSK3 β (Figura 17) (Cross et al. 1995). Estos resultados están en línea con el papel pro-supervivencia de CCR7. Además estudiamos las vías de señalización activadas por CCR7 que están implicadas en la regulación de la actividad de GSK3 β . Mediante el uso de inhibidores o activadores, dominantes negativos y siRNAs demostramos que la fosforilación de GSK3 β no depende de la activación de los módulos de señalización que regulan la quimiotaxis ni la velocidad de las CD_s. Esto es, ni la activación de MAPKs (Figura 25) ni de proteínas G de la familia $\alpha_{12/13}$ o Pyk2 (Figuras 26 y 27) son necesarias para que CCR7 induzca fosforilación de GSK3 β . Sin embargo, comprobamos que para que se fosforile GSK3 β es necesario que se active el módulo de señalización implicado en la regulación de la supervivencia de las CD_s a través de CCR7, es decir, deben activarse proteínas G de la familia $\alpha_{i/0}$ y el dímero $\beta\gamma$ asociado a estas proteínas, PI3K y Akt1 (Figuras 22, 23 y 24).

Los receptores de quimioquinas son GPCRs que señalizan a través de proteínas G heterotriméricas. Estas proteínas constituyen una familia de gran diversidad y la especificidad en la señalización a través de GPCRs puede estar determinada en parte por la expresión de tipos concretos de proteínas G en cada tipo celular en un momento dado. En las CDs maduras las proteínas G α , β y γ mayoritarias se presentan en la [Tabla 2](#). En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha mostrado que la activación de proteínas G $\alpha_{i/0}$ es necesaria para la regulación de la quimiotaxis y la supervivencia de las CDs inducida por CCR7, pero no para regular la velocidad migratoria, para lo cual es necesario que se activen proteínas G $\alpha_{12/13}$ (Sanchez-Sanchez et al. 2006). En línea con estos resultados, observamos que las proteínas G α_{12} y α_{13} no están implicadas en la fosforilación de GSK3 β en Ser9 ([Figura 26](#)), siendo proteínas G de la familia $\alpha_{i/0}$ las principales responsables de la inhibición de GSK3 β ([Figura 22](#)). En este sentido Goulimari y colaboradores también han descrito que la fosforilación de GSK3 β en el residuo de Ser9 es independiente de la activación de proteínas G $\alpha_{12/13}$ (Goulimari et al. 2008). Cabe destacar que la actividad de GSK3 β puede ser regulada también mediante fosforilación en un residuo de tirosina (Tyr216) que se encuentra en el centro activo de la molécula. Esta fosforilación, al contrario que la de Ser9, aumenta la actividad de GSK3 β (Hughes et al. 1993). Se han descrito varias tirosina quinasas que fosforilan este residuo, entre las cuales se encuentran Csk y Pyk2 (Fan et al. 2003; Sayas et al. 2006), que son activadas por proteínas G $\alpha_{q/11}$ y $\alpha_{12/13}$, respectivamente. De tal modo que las proteínas G $\alpha_{12/13}$ podrían estar regulando la actividad de GSK3 β actuando sobre el residuo de Tyr216, en vez de sobre el de Ser9. Sin embargo, hemos observado que la activación de CCR7 no aumenta la fosforilación de GSK3 β en Tyr216 (resultados no mostrados), con lo cual es poco probable que se esté dando este tipo de regulación aunque sería necesario un estudio más detallado para poder descartar por completo esta posibilidad, así como para determinar si otras proteínas G, como son $\alpha_{q/11}$ o α_s , que también están presentes en las CDs maduras ([Tabla 2](#)), pudieran regular la actividad de GSK3 β .

La activación de las proteínas G heterotriméricas actúa sobre un gran número de moléculas efectoras ya sea a través de la subunidad α o del dímero $\beta\gamma$. En este sentido existen trabajos previos que muestran que la inhibición de la quimiotaxis producida por el tratamiento con PTX, que inhibe tanto la subunidad $\alpha_{i/0}$ como el dímero $\beta\gamma$, se debe en realidad a la inhibición del heterodímero $\beta\gamma$ y que la proteína G $\alpha_{i/0}$ no está implicada en la regulación de la quimiotaxis (Neptune et al. 1999). Asimismo Taurin y colaboradores han demostrado previamente la implicación de la actividad del heterodímero $\beta\gamma$ en la fosforilación de GSK3 β en Ser9 a través de la activación de PKA (Taurin et al. 2007). Nuestros resultados indican que la activación del dímero $\beta\gamma$ participa en la fosforilación de GSK3 β en Ser9 tras la estimulación de CCR7 ([Figura 22B](#)), ya que la fosforilación es menor en las CDs que expresan $\alpha_{\text{Transducina}}$, que actúa inhibiendo la activación del heterodímero. Sin embargo, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indican que PKA no está implicada en la fosforilación de GSK3 β en las CDs (resultados no mostrados).

DISCUSIÓN

La activación del eje formado por PI3K y Akt1 es muy importante en la regulación de la supervivencia de las CD_s (Sanchez-Sanchez et al. 2004). Además Akt1 es una de las principales quinasas que fosforilan el residuo de Ser9 de GSK3 β (Cross et al. 1995), por lo que estudiamos la implicación de este eje en la inhibición de GSK3 β . Observamos que en CD_s tratadas con LY294002, un inhibidor general de PI3K, o con un inhibidor específico de Akt1/2, se produce una gran reducción en la fosforilación de GSK3 β inducida por CCL19 y CCL21 (Figura 23), aunque ésta no se inhibe por completo, indicando la existencia de otras quinasas activadas por CCR7 que fosforilan GSK3 β . Entre las quinasas que regulan la fosforilación de GSK3 β en Ser9 se encuentran también PKA (Li et al. 2000), que parece no ejercer este papel en las CD_s (resultados no mostrados), y PKC (Goode et al. 1992). El empleo de inhibidores generales de PKC inhibe la fosforilación de GSK3 β en Ser9 en CD_s estimuladas con CCL19 y CCL21 (Figura 28), lo cual indica que la activación de PKCs inducida por CCR7 participa en la inhibición de GSK3 β . Aunque se han descrito isoformas que fosforilan e inhiben GSK3 β y que regulan diferentes procesos como la polarización celular (Etienne-Manneville et al. 2003), dada la gran diversidad de la familia de las PKCs, será necesario más trabajo para caracterizar las isoformas concretas de PKC implicadas en la fosforilación de GSK3 β inducida por CCR7 en CD_s.

La inhibición de PI3K impide que se produzca la activación de Akt1 inducida por CCR7 en CD_s y, por tanto, la inhibición de GSK3 β (Figura 23A). Trabajo previo en nuestro laboratorio demostró que CCR7 activa PI3Ks de clase I, concretamente PI3K α (Sanchez-Sanchez et al. 2004), y que el uso de un inhibidor específico contra otro miembro de esta familia, PI3K δ , no afecta a la supervivencia de las CD_s ni a la activación de Akt1 inducida por CCR7 (Sanchez-Sanchez et al, resultados sin publicar). A pesar de ser PI3K γ la isoforma clásicamente activada por GPCRs (Murga et al. 1998; Krugmann et al. 1999), estudios más recientes muestran que otras PI3Ks de clase I, como PI3K β , también pueden ser activadas por GPCRs (Guillemet-Guibert et al. 2008). Esto sugiere la existencia de cierta especialización entre las PI3Ks para señalar a través de CCR7. Para testar esta posibilidad empleamos inhibidores específicos para PI3K α , PI3K β y PI3K γ , tres isoformas diferentes de la clase I de PI3K. La inhibición de PI3K γ tiene un efecto drástico sobre la activación de Akt1, que resulta completamente inhibida, pero no elimina totalmente la fosforilación de GSK3 β (Figura 24), sugiriendo de nuevo la existencia de otras quinasas activadas por CCR7 que fosforilan GSK3 β . Los resultados presentados anteriormente muestran que PKC puede estar implicada, aunque no podemos descartar la participación de otras quinasas como RSK-2 o p70S6K (Sutherland et al. 1993), cuya implicación no hemos estudiado en este trabajo. La inhibición de PI3K β no impide la fosforilación ni de Akt1 ni de GSK3 β , aunque la activación de Akt1 parece estar reducida (Figura 24). Sin embargo, carecemos de un buen control para demostrar que el inhibidor de PI3K β realmente funciona. Por tanto, por el momento no podemos extraer conclusiones definitivas con respecto al papel de PI3K β . Observamos que la inhibición de PI3K α inhibe considerablemente la activación de Akt1, aunque su efecto es aún mayor sobre la fosforilación de GSK3 β (Figura 24). Esto apunta a la posibilidad de

que PI3K α esté regulando no sólo la actividad de Akt1 sino también la de otra quinasa implicada en la fosforilación de GSK3 β . Los resultados obtenidos con respecto al papel de las diferentes isoformas de PI3K son muy interesantes, pero preliminares, ya que para confirmar esta diferencia en la función de PI3Ks sobre el eje Akt1/GSK3 β y su implicación en la regulación de la supervivencia celular es necesario un trabajo mucho más completo que el presentado en esta tesis.

En este trabajo demostramos, usando inhibidores farmacológicos, que las MAPKs ERK1/2 y JNK, que son necesarias para la regulación de la quimiotaxis inducida por CCR7, no están implicadas en la fosforilación de GSK3 β (Figura 25). Nuestros resultados son diferentes a los obtenidos por otros autores que sitúan la activación de MAPK por encima de la fosforilación de GSK3 β (Goold et al. 2005). Las diferencias enfatizan la importancia del contexto en la regulación de estas moléculas. Además existen diversas referencias en la bibliografía que apoyan la idea de que GSK3 β es una quinasa capaz de regular la actividad de las MAPKs (Takada et al. 2004; Abell et al. 2007; Rehani et al. 2009). En este trabajo empleamos inhibidores de GSK3 para determinar su efecto sobre la activación de ERK1/2 y Akt1 inducida por CCL19 o CCL21. No observamos que la inhibición de GSK3 afecte a la activación de estas quinastas (Figura 30), y también analizamos su efecto sobre la expresión de CCR7 en la membrana de las CDs como un control adicional.

Por otro lado demostramos que la estimulación de CCR7 da lugar a la fosforilación de FoxO a través de la activación del módulo de señalización que regula la supervivencia de las CDs, ya que es necesaria la actividad de Akt1 (Figuras 19 y 20). Esta fosforilación aumenta la traslocación al citoplasma de estos factores de transcripción (Figura 21), ya que genera sitios de unión para las proteínas 14-3-3 (Brunet et al. 1999; Brunet et al. 2002), cuya interacción con FoxO conlleva su retención en el citoplasma. Esto resulta en una menor actividad transcripcional de FoxO, lo cual reduce la expresión de genes pro-apoptóticos controlados por FoxO, como Bim (Figura 32) (Riol-Blanco et al. 2009). Por tanto, CCR7 es capaz de regular la apoptosis de las CDs porque regula la actividad de factores de transcripción como FoxO y NF- κ B, que regulan genes pro- y anti-apoptóticos, respectivamente.

Tanto FoxO como NF- κ B regulan la transcripción de miembros de la familia Bcl-2, que están implicados en mantener la supervivencia celular o bien desencadenar el proceso de apoptosis en las CDs (Motoyama et al. 1995; Bouillet et al. 1999; Nopora et al. 2002; Hou et al. 2004; Peng et al. 2005; Chen et al. 2007a; Chen et al. 2007b). FoxO regula la expresión de Bim, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, y este es uno de los principales mecanismos por los cuales FoxO ejerce su papel pro-apoptótico en las CDs (Dijkers et al. 2000; Riol-Blanco et al. 2009). Por su parte, NF- κ B regula la expresión de Bcl-XL, un miembro pro-supervivencia de la familia Bcl-2, y con ello contribuye a aumentar la supervivencia de las CDs (Chen et al. 2000; Hou et al. 2004; Sanchez-Sanchez et al. 2004; Chen et al. 2007a). La estimulación con los ligandos de CCR7 aumenta la actividad de NF- κ B

DISCUSIÓN

(Sanchez-Sanchez et al. 2004) y reduce la actividad de FoxO (Figuras 19-21). Esto se refleja en un aumento en la expresión de Bcl-XL y una reducción en la expresión de Bim, como muestran los resultados presentados en esta tesis (Figuras 31 y 32). El efecto sobre la expresión de estos miembros de la familia Bcl-2 puede ser responsable, al menos en parte, del efecto pro-supervivencia que tiene la activación de CCR7 en las CD8.

Podemos concluir, por tanto, que la activación de CCR7 induce señales intracelulares dependientes de proteínas G $\alpha_{i/0}$ y da lugar a la activación del eje formado por PI3K y Akt1 que regulan la supervivencia de las CD8. En este sentido Akt1 actúa como “eje central” de esta función de CCR7, ya que cuando se activa puede inhibir la actividad de moléculas pro-apoptóticas como GSK3 β y FoxO, y activar moléculas pro-supervivencia como NF- κ B. El efecto global de la activación de Akt1 es el aumento de la supervivencia de las CD8 expuestas a CCL19 o CCL21.

GSK3 β es una quinasa para la cual se han descrito múltiples sustratos, muchos de los cuales están implicados en el proceso de apoptosis, como NF- κ B (Hoeflich et al. 2000), β -catenina (Patel et al. 2004), Mcl-1 (Maurer et al. 2006) o p53 (Watcharasit et al. 2003), entre otros. Por tanto, nos propusimos estudiar posibles efectores del papel pro-apoptótico de GSK3 β en CD8.

En primer lugar estudiamos el efecto de esta quinasa sobre NF- κ B, dado que se sabe que GSK3 β puede regular la actividad de la vía de NF- κ B. Dependiendo del contexto celular ha sido descrito que GSK3 puede activar (Hoeflich et al. 2000; Ougolkov et al. 2005; Steinbrecher et al. 2005; Ougolkov et al. 2007) o inhibir (Demarchi et al. 2003; Sanchez et al. 2003; Buss et al. 2004; Rao et al. 2004) a NF- κ B. Además existe mucha controversia sobre el nivel en el cual GSK3 β regula la actividad de estos factores de transcripción. Uno de los principales mecanismos de regulación de la actividad de NF- κ B consiste en el control de su localización nuclear. La activación de NF- κ B por la vía clásica se produce porque se activa el complejo IKK que fosforila el inhibidor de NF- κ B, I κ B, induciendo su degradación y permitiendo así que NF- κ B sea transportado al núcleo donde puede transcribir sus genes diana (Karin et al. 2000) (Figura 6). En este sentido, existen varias referencias en las cuales se describe que la inhibición de GSK3 β no afecta a la degradación de I κ B ni a la localización nuclear de p65 (Hoeflich et al. 2000; Schwabe et al. 2002; Martin et al. 2005; Ougolkov et al. 2005; Steinbrecher et al. 2005; Ougolkov et al. 2007), sino que GSK3 β regula la actividad de NF- κ B a través de otros mecanismos como la regulación de la interacción de NF- κ B con otros activadores transcripcionales (Martin et al. 2005) o mediante mecanismos epigenéticos que afectan al estado de la cromatina de promotores específicos de NF- κ B (Ougolkov et al. 2007). Por otro lado, existen artículos en los cuales se muestra que la actividad de GSK3 β afecta a la localización de NF- κ B, ya sea regulando la degradación de I κ B actuando sobre el complejo IKK (Sanchez et al. 2003; Rao et al. 2004; Wilson et al. 2008), o bien actuando directamente sobre p65 o sobre precursores de NF- κ B como p105 (Demarchi et al. 2003; Buss et al. 2004).

Puesto que se describió que CCR7 regula la actividad de NF- κ B aumentando la traslocación al núcleo de p65 (Sanchez-Sanchez et al. 2004), comenzamos por estudiar si la actividad de GSK3 β afecta a la localización de p65 en CDs. Empleando inhibidores de GSK3 y la forma constitutivamente activa de GSK3 β demostramos que la actividad de GSK3 β dificulta la traslocación al núcleo de p65, ya que las CDs que expresan GSK3 β -CA presentan menos p65 nuclear y, por el contrario, la inhibición de GSK3 aumenta la traslocación de p65 al núcleo (Figura 34) y, consecuentemente, aumenta también la expresión de Bcl-XL (Figura 37). Además, comprobamos que el aumento en el nivel de p65 nuclear que observamos al inhibir GSK3 puede ser debido a un aumento en la degradación de I κ B, ya que el tratamiento de las CDs con tres inhibidores diferentes de GSK3 produce una reducción significativa en el nivel de I κ B (Figura 35). También hemos observado que la estimulación de las CDs con CCL19 o CCL21 produce un aumento en la fosforilación de IKK α que aumenta la actividad del complejo IKK (Hacker et al. 2006). Sin embargo, el pretratamiento de las CDs con LiCl o con un inhibidor específico de Akt1/2 no afecta a la activación de IKK α inducida por CCR7 (Figura 36). Cabe señalar, no obstante, que esto no implica que Akt1 o GSK3 β no regulen la actividad del complejo IKK, sino simplemente que no afectan a la fosforilación del residuo que nosotros hemos estudiado (IKK α Ser176/180), ya que podrían estar fosforilando otros residuos o bien regular su actividad por mecanismos diferentes a la fosforilación. Así por ejemplo, Sánchez y colaboradores propusieron un mecanismo por el cual GSK3 β puede regular la actividad de IKK, y éste no implica la fosforilación de IKK α/β (Sanchez et al. 2003). En su trabajo muestran que GSK3 β es una molécula pro-apoptótica en astrocitos, ya que su actividad inhibe NF- κ B aumentando la estabilidad de I κ B, resultados muy similares a los que nosotros hemos observado en CDs. Además demuestran que el aumento en la estabilidad de I κ B se produce porque GSK3 β en su forma activa interacciona con la subunidad reguladora del complejo IKK, IKK γ /NEMO. De este modo GSK3 β compite con IKK α/β por la asociación a IKK γ , inhibiendo la formación del complejo IKK y, por tanto, su actividad. Dados los paralelismos existentes entre el trabajo de Sánchez y colaboradores en astrocitos y nuestros resultados en CDs, es tentador especular que GSK3 β pueda regular la actividad de IKK en estas células por un mecanismo similar al descrito en astrocitos (Figura 38). Sin embargo, habrá que realizar los experimentos convenientes para poder demostrar si este modelo aplica también en las CDs.

Además de estudiar el papel de GSK3 β sobre la vía de NF- κ B como mecanismo efector de la función pro-apoptótica de esta quinasa en CDs, decidimos analizar también el efecto de GSK3 β sobre β -catenina, ya que esta proteína es un efector clásico de GSK3 β en la vía activada por Wnt (Patel et al. 2004). β -catenina regula múltiples procesos celulares porque es capaz de regular la actividad de varios factores de transcripción, entre los cuales destacamos su efecto en la transactivación de FoxO (Essers et al. 2005) y en la inhibición de NF- κ B (Deng et al. 2002), ya que son dos factores de transcripción implicados en la supervivencia de las CDs y además su actividad es regulada por CCR7. GSK3 regula la actividad de β -catenina afectando a su degradación. En condiciones

DISCUSIÓN

basales GSK3 está activa y fosforila β -catenina favoreciendo su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma, manteniendo el nivel de β -catenina reducido y, por tanto, impidiendo que regule la actividad de otros factores de transcripción. Señales que inhiben GSK3, como la activación de la vía de Wnt, impiden que esta quinasa continúe fosforilando β -catenina que, en lugar de ser degradada, se estabiliza y comienza a acumularse en el interior celular (Patel et al. 2004). Esta acumulación de β -catenina produce un aumento en el nivel de β -catenina en el núcleo, donde esta proteína puede regular la actividad de otros factores de transcripción. Nuestros resultados muestran que en las CDs GSK3 no regula la estabilidad de β -catenina, ya que ni la estimulación con CCL19 o CCL21, que anteriormente comprobamos que inhibe la actividad de GSK3, ni el tratamiento con tres inhibidores específicos diferentes de GSK3 produce un aumento en la estabilidad de β -catenina (Figura 39). A pesar de que la inhibición de GSK3 aumenta la estabilidad de β -catenina en la mayoría de las células, ya se ha descrito que en algunos cultivos de células primarias o no transformadas la inhibición de GSK3 no produce un aumento en el nivel de β -catenina (Topol et al. 2003; Steinbrecher et al. 2005), debiendo existir mecanismos alternativos que permitan regular la actividad de β -catenina en estas células. Cabe señalar que a pesar de que este resultado parezca sorprendente porque la estabilización de β -catenina es un mecanismo de acción general de GSK3, en realidad es un resultado compatible con el resto de los resultados obtenidos, dado que estaba descrito que la acumulación de β -catenina inhibe la actividad de NF- κ B (Deng et al. 2002) y aumenta la de FoxO (Essers et al. 2005). Teniendo en cuenta la función que tienen NF- κ B y FoxO en la supervivencia de las CDs, la acumulación de β -catenina tendría efectos pro-apoptóticos y, por tanto, GSK3 debería ser una molécula anti-apoptótica, ya que inhibe β -catenina. Sin embargo, los resultados presentados muestran que GSK3 es una molécula pro-apoptótica y que su actividad inhibe la activación de NF- κ B, por lo que en el contexto de la señalización de CCR7 en las CDs no resulta sorprendente que GSK3 no regule la estabilidad de β -catenina en estas células.

Finalmente analizamos si GSK3 β puede regular la actividad de FoxO, ya que es un factor de transcripción implicado en la apoptosis de las CDs y cuya actividad, al igual que la de GSK3 β , es regulada por CCR7. Como se explicó anteriormente uno de los principales niveles de regulación de la actividad de FoxO consiste en variar su localización (Figura 7). En condiciones pro-apoptóticas FoxO se localiza en el núcleo donde transcribe genes pro-apoptóticos como Bim (Dijkers et al. 2000). Sin embargo, estímulos pro-supervivencia activan Akt1 que fosforila FoxO creando sitios de unión para las proteínas 14-3-3, las cuales se unen a FoxO y lo transportan al citoplasma donde es retenido e inhibido (Brunet et al. 1999; Brunet et al. 2002). Los experimentos realizados con inhibidores de GSK3, con siRNA para reducir específicamente GSK3 β y con la forma de GSK3 β constitutivamente activa, muestran que GSK3 β regula la localización tanto de FoxO1 como de FoxO3 en las CDs (Figura 40-42). Los resultados muestran que el bloqueo de GSK3 β , con inhibidores o siRNA, produce una reducción en la localización en el núcleo tanto de FoxO1 como de FoxO3, mientras que una mayor

actividad de GSK3 β tiene como consecuencia un aumento en el nivel de FoxO1 y FoxO3 nuclear. Estos resultados confirman el papel pro-apoptótico de GSK3 β , ya que su actividad aumenta la presencia de FoxO en el núcleo donde puede potenciar la expresión de genes pro-apoptóticos. En este sentido, también observamos una menor expresión de Bim en las CDs en las que GSK3 se encuentra inhibida (Figura 43), en línea con la disminución obtenida en el nivel de FoxO nuclear en CDs tratadas con los inhibidores de GSK3.

Anteriormente demostramos que en las CDs CCR7 inhibe FoxO alterando su localización a través de la activación de Akt1 (Figuras 19-21). Sin embargo, también hemos demostrado que la inhibición de GSK3 en CDs no afecta a la activación de Akt1 inducida por CCR7 (Figura 30), lo cual indica que GSK3 debe estar regulando la localización de FoxO por un mecanismo diferente. Puesto que GSK3 actúa sobre una gran variedad de sustratos decidimos analizar las secuencias de FoxO1 y FoxO3 en busca de potenciales sitios de fosforilación de GSK3 y observamos la existencia de múltiples dianas potenciales para esta quinasa tanto en FoxO1 como en FoxO3 (Figura 44). Esto unido al hecho de que Rena y colaboradores demostraron que GSK3 β puede fosforilar FoxO1 *in vitro* (Rena et al. 2002), nos llevó a plantear la posibilidad de que GSK3 β esté regulando la localización de FoxO fosforilando directamente a este factor de transcripción en sitios que, por ejemplo, puedan afectar a su asociación con las proteínas 14-3-3, produciendo su disociación y, por tanto, aumentando así el nivel de FoxO nuclear. En este sentido hemos demostrado que GSK3 β y FoxO3 interactúan en CDs en condiciones pro-apoptóticas, ya que en estas condiciones realizamos experimentos de inmunoprecipitación tanto de GSK3 β como de FoxO3 y, en ambos casos observamos la otra proteína en el inmunoprecipitado (Figura 45). Estos experimentos no demuestran que FoxO sea realmente un sustrato de GSK3 β *in vivo*, pero dado que i) sí lo es *in vitro*, ii) que existen múltiples dianas de GSK3 β en la secuencia de FoxO y iii) que interactúan *in vivo*, es muy tentador especular con esta posibilidad. Más aún si tenemos en cuenta que algunas de las potenciales dianas de fosforilación de GSK3 β se encuentran en o muy próximas a los sitios de interacción de FoxO con las proteínas 14-3-3. Sin embargo, aún se necesitan más evidencias experimentales para poder confirmar o descartar esta hipótesis, ya que sería necesario demostrar que GSK3 β puede fosforilar FoxO *in vivo*, identificar los sitios fosforilados por GSK3 β en FoxO y demostrar que la mutación en estos sitios revierte el efecto de la actividad de GSK3 β sobre la traslocación de FoxO al núcleo. Cabe destacar que también se ha descrito que GSK3 β interactúa con 14-3-3 ζ , y que esta interacción aumenta la actividad de GSK3 β sobre alguno de sus sustratos (Agarwal-Mawal et al. 2003), aunque existe controversia al respecto ya que otros autores desmienten este efecto (Matthews et al. 2005). Deberán realizarse los experimentos pertinentes para determinar si GSK3 β puede regular de algún modo a las proteínas 14-3-3 en las CDs.

DISCUSIÓN

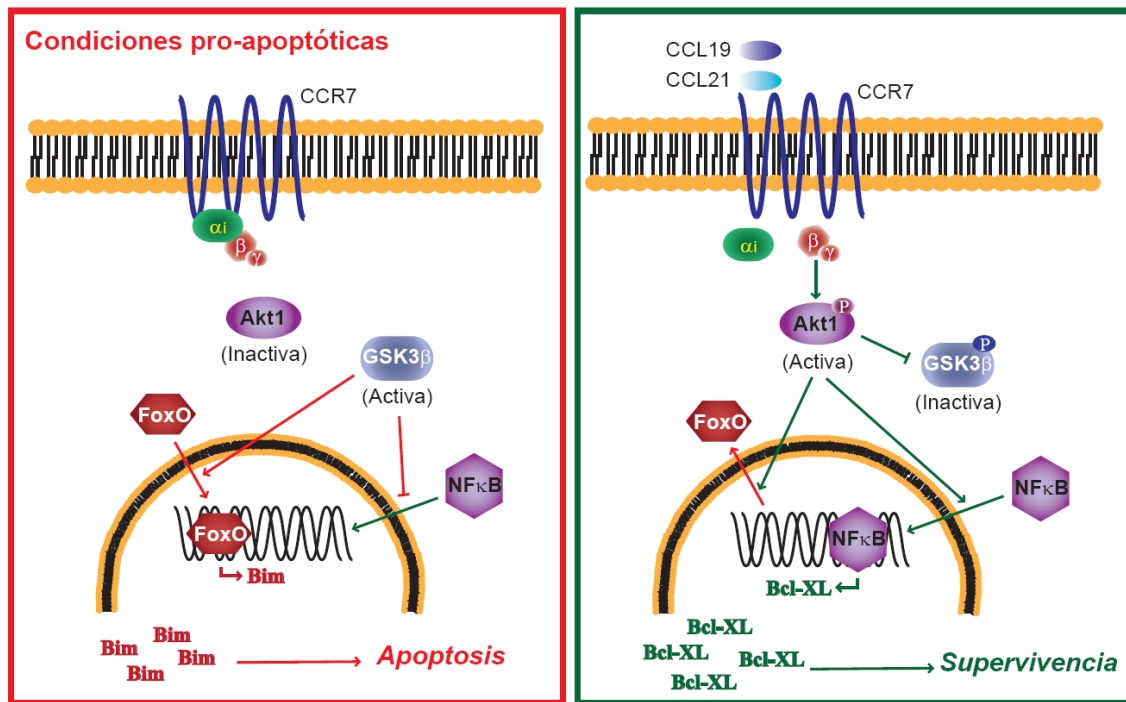


Figura 49. Modelo de la relación entre GSK3 β y Akt1 en la regulación de la localización de FoxO y NF- κ B. (Izquierda) En condiciones apoptóticas (privación de factor) Akt1 se encuentra inactiva y GSK3 β está activa. En estas condiciones GSK3 β contribuye a mantener NF- κ B, un factor de transcripción pro-supervivencia, retenido en el citosol y, por tanto, inhibido. Asimismo favorece la traslocación de FoxO, un factor de transcripción pro-apoptótico, al núcleo, donde transcribe genes pro-apoptóticos como Bim. A través de estos mecanismos la actividad de GSK3 β favorece la apoptosis de las CDs. (Derecha) En presencia de los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21, se produce la activación de Akt1 a través de proteínas G α_i . Akt1 fosforila e inhibe a GSK3 β , impidiendo la acción de esta molécula sobre FoxO y NF- κ B. Además la forma activa de Akt1 favorece la traslocación de FoxO al citosol, donde se encuentra inhibido y no puede transcribir genes pro-apoptóticos, y la traslocación al núcleo de NF- κ B, cuya actividad permite la transcripción de genes pro-supervivencia como Bcl-XL. De este modo la activación de CCR7 regula la actividad de factores de transcripción como FoxO y NF- κ B a través de quinasas como Akt1 y GSK3 β , incrementando así la supervivencia de las CDs.

Finalmente sobreexpresando una forma constitutivamente activa de GSK3 β , demostramos que para que Akt1 pueda llevar a cabo su función pro-supervivencia es necesario que se produzca la inhibición de GSK3 β . El efecto que tiene la inhibición de GSK3 β sobre NF- κ B y FoxO es el mismo que se observa con la activación de Akt1. Sabemos que el efecto pro-supervivencia de Akt1 no se deben sólo a su capacidad de fosforilar e inhibir a GSK3 β , ya que Akt1 actúa también directamente sobre FoxO (Brunet et al. 1999) y la vía de NF- κ B (Bai et al. 2009). Sin embargo, dado que la actividad de GSK3 β tiene efectos contrarios a la de Akt1 sobre la localización de NF- κ B y FoxO, sí podemos especular que Akt1 necesite inhibir GSK3 β para poder ejercer completamente su función pro-supervivencia, evitando que esta quinasa contrarreste su efecto anti-apoptótico. Los experimentos realizados muestran que la expresión de GSK3 β -CA en CDs impide que CCL19 o CCL21 aumenten la expresión de Bcl-XL y disminuyan la de Bim (Figuras 47 y 48), demostrando que si GSK3 β no puede ser inhibida las quimioquinas no pueden activar NF- κ B ni inhibir la actividad de FoxO, a pesar de que Akt1 se active. Estos resultados demuestran que GSK3 β debe ser inhibida para que

la activación de Akt1 inducida por CCR7 pueda incrementar la supervivencia de las CDs (Figuras 49). De no producirse la inhibición de GSK3 β , el pool de GSK3 β que permaneciese activo contribuiría a aumentar la actividad de FoxO y a reducir la de NF- κ B contrarrestando el efecto pro-supervivencia de Akt1.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

1. Usando inhibidores farmacológicos mostramos que GSK3 es una molécula que tiene un papel pro-apoptótico en las CD_s humanas. Mediante el uso de un inhibidor de GSK3 y marcadores que detectan selectivamente células apoptóticas en el ganglio linfático, mostramos, empleando microscopía de tipo multifotón, que GSK3 también ejerce efectos pro-apoptóticos *in vivo*.
2. Existen dos isoformas de GSK3, GSK3 α y GSK3 β . La utilización de un siRNA específico para GSK3 β o GSK3 α , demuestra que GSK3 β juega un papel predominante en la regulación de la apoptosis en las CD_s. En concordancia con este concepto, la expresión de una forma constitutivamente activa de GSK β aumenta la apoptosis de las CD_s de manera considerable.
3. La estimulación de CCR7 con sus ligandos inhibe la actividad de GSK3 β induciendo la fosforilación del residuo de serina 9 de esta quinasa. El uso de la toxina pertúsica, que inhibe las proteínas de la familia G $\alpha_{i/0}$, y la sobreexpresión de $\alpha_{\text{Transducina}}$ (α_T), un dominante negativos del dímero $\beta\gamma$, demuestra que la fosforilación/inhibición de GSK3 β inducida por CCR7 está mediada por proteínas de la familia G $\alpha_{i/0}$ y por el dímero $\beta\gamma$. El empleo de inhibidores de PI3K y Akt demuestra asimismo que la mayor parte de la fosforilación de GSK3 β está mediada por Akt.
4. La estimulación de CCR7 inhibe la actividad de factores de transcripción de la familia FoxO (que son moléculas que ejercen un papel pro-apoptótico en las CD_s). Esta inhibición está mediada por Akt1, que fosforila FoxO e induce su traslocación del núcleo al citoplasma, donde no puede ejercer su actividad transcripcional. Esto da lugar a una reducción de la expresión de Bim, una molécula pro-apoptótica cuya expresión está regulada por FoxO.
5. La estimulación de CCR7 con CCL19 o CCL21 induce activación de NF- κ B. Como consecuencia, aumenta la expresión de Bcl-XL, un factor pro-supervivencia regulado por NF- κ B. El incremento de Bcl-XL y la disminución de Bim (punto 4) favorece una mayor supervivencia de las CD_s estimuladas con CCL19 o CCL21.

CONCLUSIONES

6. La forma activa de GSK3 β se opone a la traslocación de NF- κ B al núcleo, lo que resulta en la reducción del nivel de NF- κ B nuclear. Por el contrario, la inhibición farmacológica de GSK3 da lugar a una mayor degradación de I κ B, un inhibidor de NF- κ B que retiene a esta molécula en el citoplasma, lo que favorece la traslocación de NF- κ B al núcleo y una mayor expresión de Bcl-XL.
7. Ni el uso de inhibidores de GSK3 ni la estimulación con los ligandos de CCR7 producen cambio alguno en el nivel de β -catenina en las CDs. Por tanto, a diferencia de otros sistemas celulares, GSK3 no regula la degradación de β -catenina en las CDs.
8. La actividad de GSK3 β regula la localización de FoxO, ya que la expresión de una forma constitutivamente activa de esta quinasa aumenta el nivel de FoxO1/3 nuclear y, por el contrario, su inhibición, empleando inhibidores farmacológicos o siRNA específico de GSK3 β , produce una disminución significativa en el nivel de FoxO1/3 nuclear. La disminución de FoxO1/3 se refleja en la reducción de la expresión de Bim.
9. Experimentos de co-inmunoprecipitación demuestran que GSK3 β y FoxO3 interactúan en las CDs. Dado que, por un lado, existen secuencias consenso para GSK3 en FoxO y, por otro, que GSK3 puede fosforilar FoxO1 *in vitro*, es posible que GSK3 β fosforile directamente a FoxO en las CDs, regulando así su localización.
10. Experimentos donde se sobreexpresó la forma constitutivamente activa de GSK3 β demuestran que la forma activa de esta quinasa contrarresta el efecto pro-supervivencia de Akt1. Como se indicó más arriba, probablemente esto se debe a que la forma activa de GSK3 β inhibe a NF- κ B y activa a FoxO. Por tanto, para que Akt1 pueda cumplir su función pro-supervivencia tras la estimulación de CCR7, se necesita inhibir la actividad de GSK3 β .

BIBLIOGRAFÍA

- Abell, A. N., D. A. Granger and G. L. Johnson (2007). "MEKK4 stimulation of p38 and JNK activity is negatively regulated by GSK3beta." *J Biol Chem* **282**(42): 30476-84.
- Agarwal-Mawal, A., H. Y. Qureshi, P. W. Cafferty, Z. Yuan, D. Han, R. Lin and H. K. Paudel (2003). "14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex." *J Biol Chem* **278**(15): 12722-8.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." *Curr Biol* **7**(4): 261-9.
- Aliberti, J., C. Reis e Sousa, M. Schito, S. Hieny, T. Wells, G. B. Huffnagle and A. Sher (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells." *Nat Immunol* **1**(1): 83-7.
- Allen, S. J., S. E. Crown and T. M. Handel (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." *Annu Rev Immunol* **25**: 787-820.
- Arai, H., C. L. Tsou and I. F. Charo (1997). "Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: evidence that directed migration is mediated by betagamma dimers released by activation of Galphai-coupled receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14495-9.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.
- Baekkevold, E. S., T. Yamanaka, R. T. Palframan, H. S. Carlsen, F. P. Reinholt, U. H. von Andrian, P. Brandtzaeg and G. Haraldsen (2001). "The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment." *J Exp Med* **193**(9): 1105-12.
- Bai, D., L. Ueno and P. K. Vogt (2009). "Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt." *Int J Cancer*.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-52.
- Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, S. Marion, R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2005). "An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior." *Cell* **122**(2): 261-73.
- Beinke, S. and S. C. Ley (2004). "Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology." *Biochem J* **382**(Pt 2): 393-409.
- Beurel, E. and R. S. Jope (2006). "The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways." *Prog Neurobiol* **79**(4): 173-89.
- Bouillet, P., D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Kontgen, J. M. Adams and A. Strasser (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." *Science* **286**(5445): 1735-8.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-68.
- Brunet, A., F. Kanai, J. Stehn, J. Xu, D. Sarbassova, J. V. Frangioni, S. N. Dalal, J. A. DeCaprio, M. E. Greenberg and M. B. Yaffe (2002). "14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport." *J Cell Biol* **156**(5): 817-28.
- Brunet, C. L., R. H. Gunby, R. S. Benson, J. A. Hickman, A. J. Watson and G. Brady (1998). "Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers." *Cell Death Differ* **5**(1): 107-15.
- Buss, H., A. Dorrie, M. L. Schmitz, R. Frank, M. Livingstone, K. Resch and M. Kracht (2004). "Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity." *J Biol Chem* **279**(48): 49571-4.

BIBLIOGRAFÍA

- Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzone and H. E. Hamm (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." Endocr Rev **24**(6): 765-81.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573): 1655-7.
- Cantley, L. C. and B. G. Neel (1999). "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4240-5.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science **282**(5392): 1318-21.
- Carlsen, H. S., G. Haraldsen, P. Brandtzaeg and E. S. Baekkevold (2005). "Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules." Blood **106**(2): 444-6.
- Claing, A., S. A. Laporte, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (2002). "Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins." Prog Neurobiol **66**(2): 61-79.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-9.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science **286**(5447): 2098-102.
- Chen, C., L. C. Edelstein and C. Gelinas (2000). "The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L)." Mol Cell Biol **20**(8): 2687-95.
- Chen, M., L. Huang, Z. Shabier and J. Wang (2007a). "Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets." Mol Immunol **44**(10): 2558-65.
- Chen, M., L. Huang and J. Wang (2007b). "Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity." Blood **109**(10): 4360-7.
- Chen, M., Y. H. Wang, Y. Wang, L. Huang, H. Sandoval, Y. J. Liu and J. Wang (2006). "Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance." Science **311**(5764): 1160-4.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell **116**(2): 205-19.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-41.
- de Brevern, A. G., H. Wong, C. Tournamille, Y. Colin, C. Le Van Kim and C. Etchebest (2005). "A structural model of a seven-transmembrane helix receptor: the Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC)." Biochim Biophys Acta **1724**(3): 288-306.
- De Vries, L., B. Zheng, T. Fischer, E. Elenko and M. G. Farquhar (2000). "The regulator of G protein signaling family." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 235-71.
- Demarchi, F., C. Bertoli, P. Sandy and C. Schneider (2003). "Glycogen synthase kinase-3 beta regulates NF-kappa B1/p105 stability." J Biol Chem **278**(41): 39583-90.
- Deng, J., S. A. Miller, H. Y. Wang, W. Xia, Y. Wen, B. P. Zhou, Y. Li, S. Y. Lin and M. C. Hung (2002). "beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer." Cancer Cell **2**(4): 323-34.
- Dieu-Nosjean, M. C., A. Vicari, S. Lebecque and C. Caux (1999). "Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines." J Leukoc Biol **66**(2): 252-62.
- Dijkers, P. F., R. H. Medema, J. W. Lammers, L. Koenderman and P. J. Coffey (2000). "Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1." Curr Biol **10**(19): 1201-4.
- Dudda, J. C. and S. F. Martin (2004). "Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments." Trends Immunol **25**(8): 417-21.

- Duronio, V. (2008). "The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway." Biochem J **415**(3): 333-44.
- Dutton, R. W., L. M. Bradley and S. L. Swain (1998). "T cell memory." Annu Rev Immunol **16**: 201-23.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.
- Eom, T. Y., K. A. Roth and R. S. Jope (2007). "Neural precursor cells are protected from apoptosis induced by trophic factor withdrawal or genotoxic stress by inhibitors of glycogen synthase kinase 3." J Biol Chem **282**(31): 22856-64.
- Essers, M. A., L. M. de Vries-Smits, N. Barker, P. E. Polderman, B. M. Burgering and H. C. Korswagen (2005). "Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling." Science **308**(5725): 1181-4.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity." Nature **421**(6924): 753-6.
- Fan, G., L. M. Ballou and R. Z. Lin (2003). "Phospholipase C-independent activation of glycogen synthase kinase-3beta and C-terminal Src kinase by Galphaq." J Biol Chem **278**(52): 52432-6.
- Fang, X., S. X. Yu, Y. Lu, R. C. Bast, Jr., J. R. Woodgett and G. B. Mills (2000). "Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 11960-5.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." Science **272**(5258): 50-3.
- Feig, C. and M. E. Peter (2007). "How apoptosis got the immune system in shape." Eur J Immunol **37 Suppl 1**: S61-70.
- Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz and A. Rot (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol **8**(5): 362-71.
- Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf and M. Lipp (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**(1): 23-33.
- Foster, F. M., C. J. Traer, S. M. Abraham and M. J. Fry (2003). "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3037-40.
- Franke, T. F. (2008). "PI3K/Akt: getting it right matters." Oncogene **27**(50): 6473-88.
- Gao, T., F. Furnari and A. C. Newton (2005). "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth." Mol Cell **18**(1): 13-24.
- Garg, S., A. Oran, J. Wajchman, S. Sasaki, C. H. Maris, J. A. Kapp and J. Jacob (2003). "Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells in vivo." Nat Immunol **4**(9): 907-12.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. A. Ben-Sasson (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol **119**(3): 493-501.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-60.
- Goode, N., K. Hughes, J. R. Woodgett and P. J. Parker (1992). "Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes." J Biol Chem **267**(24): 16878-82.
- Goold, R. G. and P. R. Gordon-Weeks (2005). "The MAP kinase pathway is upstream of the activation of GSK3beta that enables it to phosphorylate MAP1B and contributes to the stimulation of axon growth." Mol Cell Neurosci **28**(3): 524-34.
- Goulimari, P., H. Knieling, U. Engel and R. Grosse (2008). "LARG and mDia1 link Galpha12/13 to cell polarity and microtubule dynamics." Mol Biol Cell **19**(1): 30-40.

BIBLIOGRAFÍA

- Graham, G. J. (2009). "D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes." *Eur J Immunol* **39**(2): 342-51.
- Graves, J. D., Y. Gotoh, K. E. Draves, D. Ambrose, D. K. Han, M. Wright, J. Chernoff, E. A. Clark and E. G. Krebs (1998). "Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1." *EMBO J* **17**(8): 2224-34.
- Green, D. R., R. A. Knight, G. Melino, A. Finazzi-Agro and S. Orrenius (2004). "Ten years of publication in cell death." *Cell Death Differ* **11**(1): 2-3.
- Guillemet-Guibert, J., K. Bjorklof, A. Salpekar, C. Gonella, F. Ramadani, A. Bilancio, S. Meek, A. J. Smith, K. Okkenhaug and B. Vanhaesebroeck (2008). "The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(24): 8292-7.
- Gunn, M. D., S. Kyuwa, C. Tam, T. Kakiuchi, A. Matsuzawa, L. T. Williams and H. Nakano (1999). "Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization." *J Exp Med* **189**(3): 451-60.
- Hacker, H. and M. Karin (2006). "Regulation and function of IKK and IKK-related kinases." *Sci STKE* **2006**(357): re13.
- Hakem, R., A. Hakem, G. S. Duncan, J. T. Henderson, M. Woo, M. S. Soengas, A. Elia, J. L. de la Pompa, D. Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S. A. Kaufman, S. W. Lowe, J. M. Penninger and T. W. Mak (1998). "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo." *Cell* **94**(3): 339-52.
- Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." *J Biol Chem* **273**(2): 669-72.
- Hawkins, P. T., T. R. Jackson and L. R. Stephens (1992). "Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase." *Nature* **358**(6382): 157-9.
- Hetman, M., J. E. Cavanaugh, D. Kimelman and Z. Xia (2000). "Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal." *J Neurosci* **20**(7): 2567-74.
- Hoeflich, K. P., J. Luo, E. A. Rubie, M. S. Tsao, O. Jin and J. R. Woodgett (2000). "Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation." *Nature* **406**(6791): 86-90.
- Hou, W. S. and L. Van Parijs (2004). "A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells." *Nat Immunol* **5**(6): 583-9.
- Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." *Cell* **103**(6): 839-42.
- Huang, H. and D. J. Tindall (2007). "Dynamic FoxO transcription factors." *J Cell Sci* **120**(Pt 15): 2479-87.
- Hughes, K., E. Nikolakaki, S. E. Plyte, N. F. Totty and J. R. Woodgett (1993). "Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation." *EMBO J* **12**(2): 803-8.
- Ivankovic-Dikic, I., E. Gronroos, A. Blaukat, B. U. Barth and I. Dikic (2000). "Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins." *Nat Cell Biol* **2**(9): 574-81.
- Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2005). "Overview of cell death signaling pathways." *Cancer Biol Ther* **4**(2): 139-63.
- Jope, R. S. and G. V. Johnson (2004). "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3." *Trends Biochem Sci* **29**(2): 95-102.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman and R. A. Lang (2002). "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens." *Immunity* **17**(2): 211-20.
- Kamath, A. T., J. Pooley, M. A. O'Keeffe, D. Vremec, Y. Zhan, A. M. Lew, A. D'Amico, L. Wu, D. F. Tough and K. Shortman (2000). "The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations." *J Immunol* **165**(12): 6762-70.

- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity." *Annu Rev Immunol* **18**: 621-63.
- Katso, R., K. Okkenhaug, K. Ahmadi, S. White, J. Timms and M. D. Waterfield (2001). "Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 615-75.
- Kohout, T. A., S. L. Nicholas, S. J. Perry, G. Reinhart, S. Junger and R. S. Struthers (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): 23214-22.
- Krugmann, S., P. T. Hawkins, N. Pryer and S. Braselmann (1999). "Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits." *J Biol Chem* **274**(24): 17152-8.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(8): 589-98.
- Li, J. and J. Yuan (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." *Oncogene* **27**(48): 6194-206.
- Li, M., X. Wang, M. K. Meintzer, T. Laessig, M. J. Birnbaum and K. A. Heidenreich (2000). "Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta." *Mol Cell Biol* **20**(24): 9356-63.
- Lindsten, T., A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan, S. J. Korsmeyer, G. R. MacGregor and C. B. Thompson (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell* **6**(6): 1389-99.
- Luther, S. A., H. L. Tang, P. L. Hyman, A. G. Farr and J. G. Cyster (2000). "Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12694-9.
- MacAulay, K., B. W. Doble, S. Patel, T. Hansotia, E. M. Sinclair, D. J. Drucker, A. Nagy and J. R. Woodgett (2007). "Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism." *Cell Metab* **6**(4): 329-37.
- Malbon, C. C. (2005). "Beta-catenin, cancer, and G proteins: not just for frizzleds anymore." *Sci STKE* **2005**(292): pe35.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." *Cell* **129**(7): 1261-74.
- Marsland, B. J., P. Battig, M. Bauer, C. Ruedl, U. Lassing, R. R. Beerli, K. Dietmeier, L. Ivanova, T. Pfister, L. Vogt, H. Nakano, C. Nembrini, P. Saudan, M. Kopf and M. F. Bachmann (2005). "CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells." *Immunity* **22**(4): 493-505.
- Marte, B. M. and J. Downward (1997). "PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond." *Trends Biochem Sci* **22**(9): 355-8.
- Martin, M., K. Rehani, R. S. Jope and S. M. Michalek (2005). "Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3." *Nat Immunol* **6**(8): 777-84.
- Matthews, T. A. and G. V. Johnson (2005). "14-3-3Zeta does not increase GSK3beta-mediated tau phosphorylation in cell culture models." *Neurosci Lett* **384**(3): 211-6.
- Maurer, U., C. Charvet, A. S. Wagman, E. Dejardin and D. R. Green (2006). "Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1." *Mol Cell* **21**(6): 749-60.
- Meares, G. P. and R. S. Jope (2007). "Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis." *J Biol Chem* **282**(23): 16989-7001.

BIBLIOGRAFÍA

- Mempel, T. R., S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* **427**(6970): 154-9.
- Messam, C. A. and R. N. Pittman (1998). "Asynchrony and commitment to die during apoptosis." *Exp Cell Res* **238**(2): 389-98.
- Motoyama, N., F. Wang, K. A. Roth, H. Sawa, K. Nakayama, I. Negishi, S. Senju, Q. Zhang, S. Fujii and et al. (1995). "Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice." *Science* **267**(5203): 1506-10.
- Murga, C., L. Laguinge, R. Wetzker, A. Cuadrado and J. S. Gutkind (1998). "Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma." *J Biol Chem* **273**(30): 19080-5.
- Nakano, H., S. Mori, H. Yonekawa, H. Nariuchi, A. Matsuzawa and T. Kakiuchi (1998). "A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4." *Blood* **91**(8): 2886-95.
- Neptune, E. R., T. Iiri and H. R. Bourne (1999). "Galphai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors." *J Biol Chem* **274**(5): 2824-8.
- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." *Cell Death Differ* **6**(11): 1028-42.
- Nopora, A. and T. Brocker (2002). "Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo." *J Immunol* **169**(6): 3006-14.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning and R. Forster (2004). "CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions." *Immunity* **21**(2): 279-88.
- Opferman, J. T., A. Letai, C. Beard, M. D. Sorcinelli, C. C. Ong and S. J. Korsmeyer (2003). "Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1." *Nature* **426**(6967): 671-6.
- Ougolkov, A. V., N. D. Bone, M. E. Fernandez-Zapico, N. E. Kay and D. D. Billadeau (2007). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells." *Blood* **110**(2): 735-42.
- Ougolkov, A. V., M. E. Fernandez-Zapico, D. N. Savoy, R. A. Urrutia and D. D. Billadeau (2005). "Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells." *Cancer Res* **65**(6): 2076-81.
- Patel, S., B. Doble and J. R. Woodgett (2004). "Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: a double-edged sword?" *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 5): 803-8.
- Paterlini, M. G. (2002). "Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: implications for ligand binding and selectivity." *Biophys J* **83**(6): 3012-31.
- Peng, S., T. W. Kim, J. H. Lee, M. Yang, L. He, C. F. Hung and T. C. Wu (2005). "Vaccination with dendritic cells transfected with BAK and BAX siRNA enhances antigen-specific immune responses by prolonging dendritic cell life." *Hum Gene Ther* **16**(5): 584-93.
- Pozarowski, P., X. Huang, D. H. Halicka, B. Lee, G. Johnson and Z. Darzynkiewicz (2003). "Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation." *Cytometry A* **55**(1): 50-60.
- Prindull, G. (1995). "Apoptosis in the embryo and tumorigenesis." *Eur J Cancer* **31A**(1): 116-23.
- Rao, R., C. M. Hao and M. D. Breyer (2004). "Hypertonic stress activates glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of renal medullary interstitial cells, suppressing an NFkappaB-driven cyclooxygenase-2-dependent survival pathway." *J Biol Chem* **279**(6): 3949-55.
- Rathmell, J. C., T. Lindsten, W. X. Zong, R. M. Cinalli and C. B. Thompson (2002). "Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis." *Nat Immunol* **3**(10): 932-9.

- Rehani, K., H. Wang, C. A. Garcia, D. F. Kinane and M. Martin (2009). "Toll-like receptor-mediated production of IL-1Ra is negatively regulated by GSK3 via the MAPK ERK1/2." J Immunol **182**(1): 547-53.
- Rena, G., Y. L. Woods, A. R. Prescott, M. Pegg, T. G. Unterman, M. R. Williams and P. Cohen (2002). "Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion." EMBO J **21**(9): 2263-71.
- Riol-Blanco, L., C. Delgado-Martin, N. Sanchez-Sanchez, C. L. Alonso, M. D. Gutierrez-Lopez, G. M. Del Hoyo, J. Navarro, F. Sanchez-Madrid, C. Cabanas, P. Sanchez-Mateos and J. L. Rodriguez-Fernandez (2009). "Immunological synapse formation inhibits, via NF-kappaB and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells." Nat Immunol **10**(7): 753-60.
- Riol-Blanco, L., N. Sanchez-Sanchez, A. Torres, A. Tejedor, S. Narumiya, A. L. Corbi, P. Sanchez-Mateos and J. L. Rodriguez-Fernandez (2005). "The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed." J Immunol **174**(7): 4070-80.
- Robishaw, J. D. and C. H. Berlot (2004). "Translating G protein subunit diversity into functional specificity." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 206-9.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-28.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F., C. R. Mackay and A. Lanzavecchia (2000). "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses." Annu Rev Immunol **18**: 593-620.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, G. de la Rosa, A. Puig-Kroger, J. Garcia-Bordas, D. Martin, N. Longo, A. Cuadrado, C. Cabanas, A. L. Corbi, P. Sanchez-Mateos and J. L. Rodriguez-Fernandez (2004). "Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells." Blood **104**(3): 619-25.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco and J. L. Rodriguez-Fernandez (2006). "The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells." J Immunol **176**(9): 5153-9.
- Sanchez, J. F., L. F. Sniderhan, A. L. Williamson, S. Fan, S. Chakraborty-Sett and S. B. Maggirwar (2003). "Glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor kappaB signaling." Mol Cell Biol **23**(13): 4649-62.
- Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." Cardiovasc Res **45**(3): 528-37.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-101.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-8.
- Sayas, C. L., A. Ariaens, B. Ponsioen and W. H. Moolenaar (2006). "GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction." Mol Biol Cell **17**(4): 1834-44.
- Schmid, J. A., A. Birbach, R. Hofer-Warbinek, M. Pengg, U. Burner, P. G. Furtmuller, B. R. Binder and R. de Martin (2000). "Dynamics of NF kappa B and Ikappa Balpha studied with green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. Investigation of GFP-p65 binding to DNA by fluorescence resonance energy transfer." J Biol Chem **275**(22): 17035-42.
- Schwabe, R. F. and D. A. Brenner (2002). "Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(1): G204-11.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**(3): 459-70.

BIBLIOGRAFÍA

- Siegel, R. M., F. K. Chan, H. J. Chun and M. J. Lenardo (2000). "The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity." Nat Immunol **1**(6): 469-74.
- Steinbrecher, K. A., W. Wilson, 3rd, P. C. Cogswell and A. S. Baldwin (2005). "Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription." Mol Cell Biol **25**(19): 8444-55.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**: 271-96.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 351-8.
- Strasser, A. (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system." Nat Rev Immunol **5**(3): 189-200.
- Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-45.
- Sullivan, S. K., D. A. McGrath, D. Grigoriadis and K. B. Bacon (1999). "Pharmacological and signaling analysis of human chemokine receptor CCR-7 stably expressed in HEK-293 cells: high-affinity binding of recombinant ligands MIP-3beta and SLC stimulates multiple signaling cascades." Biochem Biophys Res Commun **263**(3): 685-90.
- Sutherland, C., I. A. Leighton and P. Cohen (1993). "Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling." Biochem J **296 (Pt 1)**: 15-9.
- Takada, Y., X. Fang, M. S. Jamaluddin, D. D. Boyd and B. B. Aggarwal (2004). "Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3beta abrogates activation of IkappaBalpha kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor." J Biol Chem **279**(38): 39541-54.
- Taurin, S., K. Hogarth, N. Sandbo, D. M. Yau and N. O. Dulin (2007). "Gbetagamma-mediated prostacyclin production and cAMP-dependent protein kinase activation by endothelin-1 promotes vascular smooth muscle cell hypertrophy through inhibition of glycogen synthase kinase-3." J Biol Chem **282**(27): 19518-25.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nat Immunol **2**(2): 129-34.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- Topol, L., X. Jiang, H. Choi, L. Garrett-Beal, P. J. Carolan and Y. Yang (2003). "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." J Cell Biol **162**(5): 899-908.
- van der Horst, A. and B. M. Burgering (2007). "Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(6): 440-50.
- Van Dop, C., G. Yamanaka, F. Steinberg, R. D. Sekura, C. R. Manclark, L. Stryer and H. R. Bourne (1984). "ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin blocks the light-stimulated hydrolysis of GTP and cGMP in retinal photoreceptors." J Biol Chem **259**(1): 23-6.
- Vanhaesebroeck, B. and M. D. Waterfield (1999). "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases." Exp Cell Res **253**(1): 239-54.
- Veis, D. J., C. M. Sorenson, J. R. Shutter and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair." Cell **75**(2): 229-40.
- Watcharasit, P., G. N. Bijur, L. Song, J. Zhu, X. Chen and R. S. Jope (2003). "Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53." J Biol Chem **278**(49): 48872-9.
- Wilson, W., 3rd and A. S. Baldwin (2008). "Maintenance of constitutive IkappaB kinase activity by glycogen synthase kinase-3alpha/beta in pancreatic cancer." Cancer Res **68**(19): 8156-63.
- Woodgett, J. R. (2001). "Judging a protein by more than its name: GSK-3." Sci STKE **2001**(100): RE12.

BIBLIOGRAFÍA

- Yanagawa, Y. and K. Onoe (2002). "CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells." Blood **100**(6): 1948-56.
- 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): 4923-9.
- Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

Gran parte de las abreviaturas y acrónimos proceden del inglés y como tal se han mantenido.

Ab: anticuerpo	GDP: Guanine DiPhosphate
ADP: Adenosine DiPhosphate	GFP: Green Fluorescent Protein
Apaf-1: Apoptosis Protease-inducing Factor 1	GM-CSF: Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
Bcl-2: B cell lymphoma 2	GPCR: G protein-coupled Receptor
Bcl-XL: B cell lymphoma extra large	GRK: G protein-coupled Receptor Kinase
BH: Bcl-2 Homology	GS: Glycogen Synthase
Bim: Bcl-2 interacting mediator of death	GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3
BSA: Bovine Serum Albumin	GTP: Guanine TriPhosphate
cAMP: cyclic Adenosine MonoPhosphate	IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein
CARD: Caspase Recruitment Domain	IκB: Inhibitor κB
CCL19: Chemokine (CC motif) Ligand 19	IKK: IκB Kinase
CCL21: Chemokine (CC motif) Ligand 21	IL-4: InterLeukin 4
CCR7: Chemokine (CC motif) Receptor 7	IP: Ioduro de Propidio
Cdc42: Cell division cycle 42	JNK: c-Jun N-terminal Kinase
CDK2: Cyclin-dependent kinase 2	KDa: Kilodalton
CDs: Células Dendríticas	LDH: Láctico DesHidrogenasa
CMFDA: 5-chloromethylfluorescein diacetate	LPS: Lipopolisacárido
CPAs: Células Presentadoras de Antígeno	MACS: Magnetic-Activated Cell Sorting
DED: Death Effector Domain	MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
DISC: Death-Inducing Signaling Complex	MHC: Major Histocompatibility Complex
DNA: DeoxyriboNucleic Acid	MST1: Mammalian Sterile20-like 1
DTT: DiTio-Treitol	NF-κB: Nuclear Factor-κB
DYRK: Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation Regulated Kinase	NEMO: NF-κB Essential Modulator
EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid	p70S6K: 70 kDa ribosomal protein S6 Kinase
EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid	p90rsk: 90-kDa ribosomal S6 kinase
ERK1/2: Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2	PBS: Phosphate-Buffered Saline
FCS: Fetal Calf Serum	PDK1: Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1
FKH: Forkhead	PE: Phycoerythrin
FoxO: Forkhead box class O	PFA: Paraformaldehído
	PH: Pleckstrin Homology
	PHLPP: PH domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase

ANEXO I

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

PI: PhosphatidyInositol

PI3K: PhosphatidyInositol 3-kinase

PKA: Protein Kinase A

PKB: Protein Kinase B

PKC: Protein Kinase C

PLL: Poly-L-Lysine

***plt*:** paucity of Lymph node T cells

PP2A: Protein Phosphatase 2A

PTEN: Phosphatase with TENSin homology

PTX: Pertussis Toxin

Pyk2: Proline-rich tyrosine(Y) kinase 2

Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate

RGS: Regulator of G-protein Signaling

RHD: Rel Homology Domain

Rho: Ras homolog

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SEM: Standard Error of the Mean

SGK: Serum and glucocorticoid-inducible Kinase

SH: Src Homology

SHIP: SH2 domain containing Inositol-5'-phosphatase

siRNA: small interfering Ribonucleic Acid

SR-FLIVO: Sulforhodamine-[Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (VAD-FMK)]

TBS: Tris-Buffered Saline

TCR: T Cell Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TORC2: mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) Complex 2

Wnt: Wingless-type MMTV integration site

Escribano C, Delgado-Martín C and Rodríguez-Fernández JL. *CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3 β* . (En prensa, J. Immunol.).

Cameron AJ, Escribano C, Saurin AT, Kostelecky B and Parker PJ. (2009) *PKC maturation is promoted by nucleotide pocket occupation independently of intrinsic kinase activity*. **Nat Struct Mol Biol.** **16**: 624 - 630.